

Etude sur la Répartition de l'Asparaginase chez les Végétaux

THÈSE

pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris
(Pharmacie)

présentée et soutenue le 23 Décembre 1939

PAR

Henriette BEAUHAIRE

Pharmacien

JURY { MM. BACH, Président.
 MASCRÉ, Professeur.
 JANOT, Maître de Conférences.

PARIS

VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS

23, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE, 23

1939

ETUDE SUR LA REPARTITION DE L'ASPARAGINASE
CHEZ LES VEGETAUX



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITÉ DE PARIS
FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1939-1940

Série U N° 39

**Etude sur la Répartition
de l'Asparaginase
chez les Végétaux**

THÈSE

pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris
(Pharmacie)

présentée et soutenue le 23 Décembre 1939

PAR

Henriette BEAUHAIRE

Pharmacien

JURY } MM. BACH, Président.
 } MASCRÉ, Professeur.
 } JANOT, Maître de Conférences.

PARIS
VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS
23, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE, 23

1939

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

MM. DAMIENS, Doyen, O. ✱, ￼ I.
P. LEBEAU, Assesseur, O. ✱, ￼ I. Membre de l'Institut
H. J. LIONNET, Secrétaire, ￼ I.

PROFESSEURS

MM. LEBEAU, O. ✱, ￼ I. Membre de l'Institut..	Pharmacie chimique.
GORIS, O. ✱, ￼ I.	Pharmacie galénique.
DAMIENS, O. ✱, ￼ I.	Chimie minérale.
HERISSEY, O. ✱, ￼ I.	Chimie biologique.
SOMMELET, ✱, ￼ I.	Chimie organique.
LUTZ, ✱, ￼ I.	Cryptogamie et Microbiologie.
FABRE, ✱, ￼ I.	Toxicologie.
LAUNOY, O. ✱, ￼ I.	Zoologie.
DELABY, ✱, ￼ I.	Chimie analytique.
PICON, ✱, ￼ I.	Physique.
MASCRE, ✱, ￼ I.	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale
BACH, ✱, ￼ I.	Botanique générale.

Doyens honoraires : MM. RADAIS, O ✱, ￼ I. — GUERIN, O. ✱, ￼ I.

Professeurs honoraires :

MM. BEHAL, G. O. ✱, ￼ I. et DELEPINE, O. ✱, ￼ I., Membres de l'Institut,
PERROT, C. ✱, ￼ I. COUTIERE, O. ✱, ￼ I. BOUGAULT, O. ✱, ￼ I.
et TASSILLY, O. ✱, ￼ I.

MAITRES DE CONFERENCES

FLEURY, ￼ A.	Hydrologie et Hygiène.
BEDEL, ￼ I.	Minéralogie, Législation et Dénatologie pharmaceutiques.
REGNIER, ￼ I.	Bactériologie.
CHARONNAT, ￼ I.	Chimie et Pharmacie Chimique.
JANOT, ￼ A.	Pharmacie galénique et biologie végétale.
VALETTE, ￼ A.	Histoire naturelle.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DOMANGE, ￼ A., travaux pratiques de 1 ^{re} année	Chimie générale et pharmaceutique.
GAUTIER, ￼ A., trav. prat. de 2 ^e et 3 ^e années.	Chimie analytique.
PARIS	Micrographie.
CORRIEZ, ￼ A.	Physique.
GUILLOT, travaux pratiques de 4 ^e année	Chimie biologique. Bromatologie, et Pharmacie chimique.
N.	Microbiologie.

Bibliothécaire en Chef : M. GARNIER, ￼ A.



A MON MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur D. BACH

*Professeur de Botanique générale à la Faculté de Pharmacie
Pharmacien des Hôpitaux de Paris
Chevalier de la Légion d'Honneur*

En témoignage de mes sentiments
très respectueux.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR M. MASCRE

*Professeur de Matière médicale à la Faculté de Pharmacie
Pharmacien des Hôpitaux de Paris
Chevalier de la Légion d'Honneur*

En témoignage de ma gratitude.

A MONSIEUR M.-M. JANOT

*Maître de Conférences
à la Faculté de Pharmacie de Paris*

Hommage très respectueux.

A LA MEMOIRE DE MES PARENTS

A LA MEMOIRE DE MA GRAND'MERE

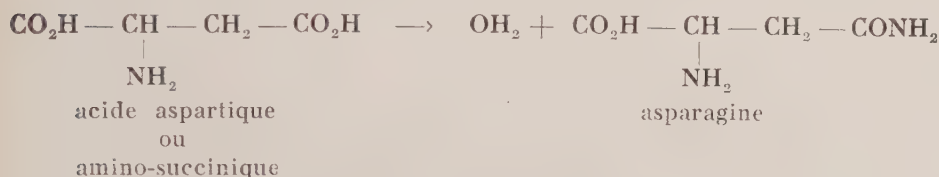
A MON FRERE ET A MA BELLE-SŒUR

Témoignage d'affection.

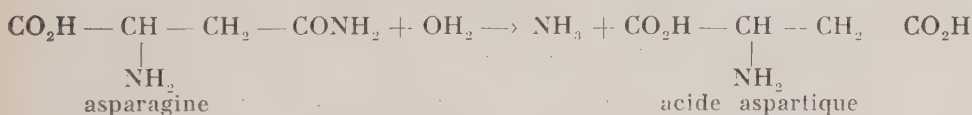
A TOUS MES AMIS

INTRODUCTION

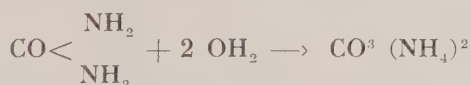
L'asparagine, découverte en 1805 par ROBIQUET junior dans la racine d'Asperge, et étudiée l'année suivante par VAUQUELIN et ROBIQUET ⁽¹⁾ est l'amide de l'acide aspartique ou acide amino-succinique :



L'asparaginase est un ferment appartenant au groupe des désamidases; elle provoque l'hydrolyse de la fonction amidée de l'asparagine :



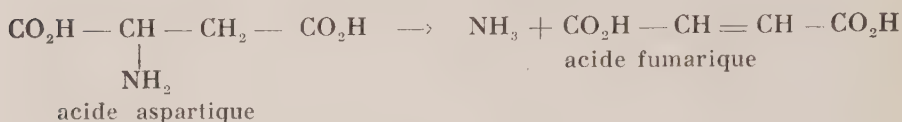
Dans son mode d'action, elle est donc analogue à l'uréase, qui hydrolyse l'urée selon l'équation :



mais elle en diffère par sa spécificité. Quand les deux enzymes sont présentes dans le même organisme, on a pu montrer, dans un cas au moins, celui de *Aspergillus niger*, que les conditions d'action, et surtout que leur évolution sont différentes dans le mycélium, ce qui établit leur individualité (BACH).

(1) VAUQUELIN (A.) et ROBIQUET. *Ann. de Chimie*, 1806, 57, 88 à 93.

Il ne faut pas confondre l'asparaginase avec l'aspartase. Celle-ci appartient au groupe des désaminases qui libèrent NH_3 de la fonction amine des acides aminés. L'aspartase, isolée par VIRTANEN et TARNANEN ⁽²⁾ du *Bacillus fluorescens*, agit sur l'acide aspartique pour donner de l'acide fumarique :



suivant une réaction d'équilibre qui a été étudiée par de nombreux auteurs et notamment par l'école anglaise de QUASTEL ⁽³⁾.

Avant de commencer l'exposé de ces recherches, je tiens à exprimer mes sentiments de vive reconnaissance à Monsieur le Professeur BACH pour l'accueil si bienveillant que j'ai trouvé dans son laboratoire, et mon entière gratitude pour l'indulgent intérêt qu'il n'a cessé de me témoigner. Il m'a inspiré le sujet de cette thèse et m'a aidée constamment de ses conseils éclairés. Je le remercie de vouloir bien m'assister jusqu'au bout en présidant aujourd'hui mon jury.

J'adresse également mes respects et l'expression de ma très vive reconnaissance à Monsieur MASCRÉ, Professeur de Matière médicale, et mes remerciements à Monsieur JANOT, Maître de Conférences, qui ont tous deux consenti à nous faire l'honneur d'être membres du jury de cette thèse.

C'est aussi pour moi un agréable devoir de remercier Monsieur LUTZ, Professeur de Cryptogamie, qui a bien voulu m'ouvrir les portes de sa riche mycothèque, et Monsieur CHARTIER, Assistant de la Chaire à la Faculté de Pharmacie de Paris, dont la complaisance m'a largement facilité le travail.

(2) VIRTANEN (A.-J.) et TARNANEN (J.). *Biochem. Zeitsch.* 1932, **250**, 193.

(3) QUASTEL (J.) et WOOLF (B.). *Biochem. Journ.*, 1926, **20**, 545.

Monsieur le Docteur WEITZ, Assistant à la Chaire de Matière médicale, fut pour moi un guide précieux, et je lui en suis sincèrement reconnaissante. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour la bienveillance qu'il m'a témoignée en toutes circonstances. Sa vaste érudition et ses connaissances bibliographiques m'ont été indispensables et il m'en a fait bénéficier avec son obligeance coutumière. Je lui en adresse mes remerciements les plus respectueusement émus.

HISTORIQUE

Dans le règne végétal, en dehors de l'uréase, on ne connaissait, avant l'année 1903, aucune diastase susceptible de produire de l'ammoniaque à partir des composés végétaux azotés. La formation de NH_3 était signalée depuis longtemps dans la décomposition des matières protéiques et des acides aminés. SHIBATA ⁽¹⁾ le premier soupçonne l'existence d' « *amidases* » dans l'*Aspergillus niger*; il constate que son mycélium sec provoque l'hydrolyse de l'urée, du biuret et de certaines autres amides, avec dégagement d'ammoniaque. Mais il semble que l'asparagine n'est que faiblement attaquée par les enzymes de l'*Aspergillus niger*, étudiées par cet auteur.

Ce travail est le point de départ de nombreuses recherches dans tous les domaines, avec les résultats les plus divers. Dans le règne animal, il semble bien démontré que l'asparaginase soit assez répandue, mais, dans le règne végétal, il faudra attendre les travaux de GEDDES et HUNTER (1928) ⁽⁵⁾ et BACH (1929) ⁽⁶⁾ ⁽⁷⁾ ⁽⁸⁾ pour aboutir à des résultats démonstratifs.

A. — RECHERCHE DE L'ASPARAGINASE CHEZ LES ANIMAUX

LANG (1903-04) ⁽⁹⁾ constate que l'asparagine et la glutamine sont hydrolysées avec formation du sel ammoniacal correspondant, avec la plus grande facilité, sous l'action d'organes ani-

(4) SHIBATA (K.). *Beitr. chem. Physiol. u. Pathol.*, 1904, 5, 384.

(5) GEDDES (W. F.) et HUNTER (A.). *Journ. of biol. Chem.*, 1928, 77, 197.

(6) BACH (D.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1929, **XI**, n° 2, 119-145.

(7) BACH (D.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1929, **XI**, n° 8, 995-1024.

(8) BACH (D.). *C. R. Soc. biol.*, 1929, **100**, 1, 831.

(9) LANG (S.). *Beitr. chem. Physiol. u. Pathol.*, 1903-1904, 5, 321.

maux divers (foie, pancréas, reins et ganglions lymphatiques du bœuf) employés à l'état frais.

Plus tard, FÜRTH et FRIEDMANN (1910) ⁽¹⁰⁾ utilisent des organes frais de porcs et de chevaux et obtiennent, surtout avec la muqueuse intestinale, la décomposition de l'asparagine.

MAEDA (1924) ⁽¹¹⁾, découvre l'asparaginase dans le tissu placentaire frais; mais ce même tissu, traité par l'acétone, perd toute activité.

Selon MIHARA et KATO (1911) ⁽¹²⁾, il y a dans les testicules du veau, un ferment qui décompose l'asparagine. Leur expérience consiste à traiter les testicules réduits en bouillie, par de l'eau chloroformée. Après avoir filtré, ils ajoutent l'asparagine et quelques gouttes de toluène, comme antiseptique, et abandonnent le tout à l'étuve pendant 76 heures. Au bout de ce temps, ils procèdent au dosage de l'ammoniaque formée. Cependant, en 1926, MAXIA ⁽¹³⁾ utilise une bouillie de testicules de veau dans du sérum physiologique et ses résultats l'autorisent à conclure qu'il ne s'y trouve pas d'enzyme désamidant l'asparagine.

CHIBNALL (1927) ⁽¹⁴⁾ conteste les conclusions de FÜRTH et FRIEDMANN ⁽¹⁵⁾. Pour lui, l'hydrolyse de l'asparagine, dans la muqueuse intestinale du porc, est due à une érepsine.

CLEMENTI et CANTAMESSA ⁽¹⁶⁾ ⁽¹⁷⁾ ⁽¹⁸⁾, après une étude approfondie de l'action d'organes animaux, concluent à l'existence de l'asparaginase chez les omnivores et les herbivores. Ces derniers animaux ont une alimentation exclusivement végétale, qui fournit de grandes quantités d'asparagine; pour que cette amide soit plus facilement et plus rapidement assimilée, les auteurs admettent qu'elle doit être transformée en acide

(10) FÜRTH (O.-V.) et FRIEDMANN (M.). *Biochem. Zeitsch.*, 1910, 26, 435.

(11) MAEDA (K.). *Biochem. Zeitsch.*, 1924, 143, 347.

(12) MIHARA (S.) et KATO (K.). *Zeitsch. für Physiol. Chem.*, 1911, 75, 443.

(13) MAXIA (M.). *Arch. farmacol. sper.*, 1926, 41, 216.

(14) GROVER (C. E.) et CHIBNALL (A. C.). *Biochem. Journ.*, 1927, 21, 857.

(15) FÜRTH (O.-V.) et FRIEDMANN (M.). *Loc. cit.*

(16) CLEMENTI (A.). *Arch. intern. physiol.*, 1922, 19, 369.

(17) CLEMENTI (A.). *Ann. biol.*, 1930, 5, 33.

(18) CLEMENTI (A.) et CANTAMESSA (G.). *Gazz. chim. ital.*, 1924, 54, 781.

aspartique. L'asparaginase produirait cette transformation ; sa présence dans l'organisme animal représente ainsi un phénomène d'adaptation biochimique ; elle semble en effet faire défaut chez les carnivores.

B. — RECHERCHE DE L'ASPARAGINASE CHEZ LES VEGETAUX

Nous avons rappelé plus haut les premiers travaux de SHIBATA sur l'*Aspergillus niger* ; on peut citer ensuite ceux d'EFFRONT ⁽¹⁹⁾ qui, en 1908, décèle la présence d'une « amidase » dans la Levure de bière et dans une bactérie : l'*Amylobacter butylicus*.

PRINGSHEIM ⁽²⁰⁾, à la même époque, utilise la Levure et une moisissure : l'*Allescheria Gayonii*. Il obtient des résultats négatifs ; mais on peut penser que ce fait est dû à ce qu'il traite ces produits par l'acétone, car BACH ⁽²¹⁾ a montré que l'acétone détruit rapidement l'asparaginase.

Nous devons cependant signaler que DOX (1909) ⁽²²⁾, utilisant le mycélium du *Penicillium Camemberti*, qu'il traite par l'acétone, puis par l'éther pour le sécher, réussit à mettre en évidence de faibles quantités d'asparaginase : 0 gr. 20 d'asparagine donnent sous son action, en 4 jours, 14 mmgr. d'ammoniaque. Ici, la destruction ne devait pas être complète.

Selon FÜRTH et FRIEDMANN ⁽²³⁾, la Levure de brasserie décompose l'asparagine, mais suivant DIETER (1922) ⁽²⁴⁾, cette Levure ne doit pas donner d'ammoniaque avec l'asparagine, tant que le milieu demeure privé de bactéries.

En somme, jusqu'en 1928, nos connaissances sur l'asparagi-

(19) EFFRONT (J.). *C. R. Acad. Sc.*, 1908, **146**, I, 779.

(20) PRINGSHEIM (H.). *Biochem. Zeits.*, 1908, **12**, 15.

(21) BACH (D.). *Loc. cit.*

(22) DOX (A. W.). *Journ. of biol. Chem.*, 1909, **6**, 461.

(23) FÜRTH (O.-V.) et FRIEDMANN (M.). *Loc. cit.*

(24) DIETER (W.). *Z. physiol. Chem.*, 1922, **120**, 281.

nase et sa répartition dans le règne végétal, sont vagues et contradictoires.

En 1928, GEDDES et HUNTER ⁽²⁵⁾ entreprennent une longue et intéressante étude de l'asparaginase, en se servant de la Levure de bière comme source de ferment.

Ils donnent d'abord plusieurs méthodes d'extraction de l'enzyme au moyen de l'eau, de la glycérine ou de l'alcool, à partir des cellules de levure, soit fraîches, soit sèches et broyées avec du quartz.

Les simples extraits aqueux de Levure fraîche non broyée possèdent un pouvoir très faible pour hydrolyser l'asparagine; plus actifs sont les extraits obtenus à partir de la Levure séchée; mais il semble qu'on n'obtient des extraits actifs qu'en broyant au préalable les cellules de Levure avec du quartz. Dans tous les cas, la glycérine à 50 % est un agent extractif plus efficace que l'eau. L'alcool a un effet destructeur sur l'asparaginase.

GEDDES et HUNTER ont essayé de concentrer et de purifier l'asparaginase, en précipitant ces extraits fermentaires par l'alcool, l'éther ou l'acétone. Un extrait aqueux de Levure broyée et séchée, dont l'activité a été déterminée préalablement, est divisé en trois parties. La première est traitée par de l'alcool éthylique, la seconde par de l'acétone et la troisième par un mélange d'alcool et d'éther. Les précipités obtenus sont séparés par centrifugation ou filtration, lavés avec le liquide précipitant, ensuite avec de l'alcool absolu et finalement avec de l'éther anhydre; GEDDES et HUNTER les séchent rapidement dans le vide sulfurique; ils agitent chaque produit avec de l'eau, et déterminent l'activité des solutions ou des suspensions résultantes. Ils n'ont jamais obtenu une hydrolyse notable de l'asparagine.

Ils concluent, ou bien que l'enzyme n'a pas été précipitée, ou bien qu'elle a été détruite; ils écartent la première hypothèse, car ils n'avaient pas éprouvé l'activité du filtrat de chaque

(25) GEDDES (W.-F.) et HUNTER (A.). *Loc. cit.*

précipité, la technique étant impraticable. Ils s'arrêtent à la seconde hypothèse car ils avaient déjà découvert, au cours de la préparation des extraits de Levure, que l'alcool détruisait le ferment; il était donc probable que l'acétone ou l'alcool-éther avaient un effet identique. Ceci expliquait la faible activité des préparations de Champignons que SHIBATA et DOX traitaient par l'acétone; de même que les résultats négatifs de PRINGSHEIM avec les Levures.

GEDDES et HUNTER ont alors essayé d'adsorber le ferment par la terre d'infusoires et l'hydroxyde ferrique.

Les résultats montrent que la terre d'infusoires adsorbe une fraction considérable d'asparaginase, à partir d'un extrait actif de Levure, mais que cette adsorption est loin d'être quantitative. L'emploi de l'hydroxyde ferrique serait pratique, s'il était facile de récupérer l'enzyme. Mais les auteurs canadiens n'ont pas poussé plus avant ces recherches, car ils ont alors pensé utiliser une technique due à ROBERTSON ⁽²⁶⁾, HOLZBERG ⁽²⁷⁾, MARSTON ⁽²⁸⁾ et FORBES ⁽²⁹⁾.

En effet, ces auteurs avaient montré que la safranine, agissant sur des solutions contenant de la trypsine, de la pepsine ou tout autre ferment protéolytique, produisait un précipité, entraînant quantitativement l'enzyme protéolytique. De ce précipité, véritable complexe colorant-enzyme, on peut, par élution, récupérer l'enzyme.

Il apparut très probable à GEDDES et HUNTER, que la safranine devait avoir sur l'asparaginase le même effet que sur la trypsine ou la pepsine. Leurs extraits de Levure sont traités par une solution de safranine à 0,5 %; le précipité formé est séparé par centrifugation et mis en suspension dans de la glycérine à 50 %. Ils déterminent l'activité de l'asparaginase sur le complexe « safranine + ferment », ainsi obtenu. Les résultats sont satisfaisants, mais cette méthode présente un incon-

(26) ROBERTSON (T. B.). *J. biol. Chem.*, 1907, **2**, 317-383.

(27) HOLZBERG (H.-L.). *J. biol. Chem.*, 1913, **14**, 335-339.

(28) MARSTON (H.-R.). *Biochem. Journ.*, 1923, **17**, 851.

(29) FORBES (J.-C.). *J. biol. Chem.*, 1926, **71**, 559.

vénient : les suspensions concentrées renferment des protéases qui peuvent libérer de l'ammoniaque en agissant sur la fonction amine de l'asparagine.

En possession d'une préparation relativement pure, GEDDES et HUNTER ont pu étudier les principales propriétés de l'asparaginase, notamment sa facile inactivation par la chaleur. A 30°, plus de la moitié de l'enzyme disparaît en 20 heures ; à 55° la destruction est complète dans le même laps de temps.

La zone d'action de l'asparaginase s'étend de pH 5,5 à pH 10,3. L'optimum est situé entre pH 7,9 et pH 8,1.

Pour GEDDES et HUNTER, l'asparaginase a une action spécifique sur la fonction amidée de l'asparagine. Le complexe « safranine + asparaginase » n'agit sur aucune des amides essayées : urée, formamide, acétamide, etc... Il semble, cependant, que la glutamine, homologue supérieur de l'asparagine, subit une hydrolyse importante quoique moins rapide que l'asparagine. KREBS (1935) ⁽³⁰⁾ rapporte cette action à l'existence d'une glutaminase.

BACH (1929) ⁽³¹⁾ a été amené à étudier simultanément l'asparaginase et l'uréase de l'*Aspergillus niger*. Il démontre qu'il s'agit bien de deux enzymes distinctes, en s'appuyant sur les faits suivants :

a) La zone d'action de l'uréase s'étend de pH 5 à pH 10 environ, avec optimum à pH 7,6. L'asparaginase commence à agir à pH 6,5 jusqu'à pH 10; son optimum est à pH 8,6.

b) L'action de l'uréase est encore appréciable à + 4° et jusqu'à 70°. L'optimum de température se place vers 45°. L'asparaginase a son optimum de température vers 40-42° pour pH 8,6, et 30-32° pour pH 7,6.

c) L'asparaginase est plus sensible que l'uréase à l'égard de l'acétone et de l'alcool ; son auto-destruction en présence de l'air est plus rapide.

Mais surtout, en suivant l'évolution des deux ferments dans le mycélium au cours de la culture, BACH démontre que ces

(30) KREBS (H.-A.). *Biochem. Journ.*, 1935, 29 (8), 1951-1969.

(31) BACH (D.). *Loc. cit.*

deux enzymes ont une évolution en quelque sorte inverse. Du 3° au 6° jour, le taux de l'uréase augmente, alors que celui de l'asparaginase baisse fortement; du 6° au 15°, l'uréase disparaît, mais le taux de l'asparaginase remonte d'une façon continue. Ce n'est qu'à partir de ce moment que l'asparaginase entre à son tour en régression.

En 1932, GÜNTHER et WAGNER ⁽³²⁾ obtiennent un résultat surprenant avec la Levure de brasserie et le *Torula utilis* séchés. La dessiccation a lieu dans le vide en présence de P_2O_5 pendant 24 heures. L'hydrolyse de l'asparagine est beaucoup plus grande qu'avec les mêmes produits à l'état frais. Ils attribuent ce résultat à une modification de la perméabilité de la membrane.

L'asparaginase a été peu étudiée dans les végétaux supérieurs. D'après KIESEL ⁽³³⁾ la cellule produit les ferments nécessaires à son métabolisme. Aussi recherche-t-il l'asparaginase dans les organes qui renferment de l'asparagine, et au moment où celle-ci y atteint sa concentration maximum.

Il utilise d'abord des graines germées de *Vicia Faba* au 29° jour; il débarrasse les germes obtenus de leurs cotylédons et les exprime fortement. Le suc est divisé en deux portions égales; l'une des deux est précipitée par le nitrate de mercure pour doser tout de suite l'asparagine: c'est la portion de contrôle; l'autre est mise à l'étuve avec du chloroforme et quelques gouttes de toluène; 23 jours après on y dose l'asparagine; c'est la portion d'autolyse. Si l'asparaginase était présente, la quantité d'asparagine devrait diminuer après l'autolyse. KIESEL obtient les mêmes résultats dans les deux cas, donc il n'y a pas eu d'hydrolyse; les germes de *Vicia Faba* ne renferment pas d'asparaginase.

Mais avec des graines germées de *Lupinus albus* de 24 jours, on obtient dans ces conditions, la disparition complète de l'asparagine présente au début de l'expérience.

(32) GÜNTHER (G.) et WAGNER (J.). *Biochem. Zeitsch.*, 1932, 254, 1.

(33) KIESEL (A.). *Zeits. physiol. Chem.*, 1909, 60, 453-476.

Dans un troisième essai, il utilise des graines germées du *Lupinus albus* de 34 jours. KIESEL utilise d'une part la plante broyée, d'autre part la plante non broyée, mais tuée par le froid. L'autolyse des sucres obtenus par expression est prolongée pendant 4 mois, à la température du laboratoire. Les résultats montrent qu'il y a disparition de l'asparagine durant l'autolyse; elle est presque totale dans le cas de la plante broyée.

Mais CHIBNALL ⁽³⁴⁾ s'élève contre cette technique : au cours d'une autolyse aussi prolongée, la disparition de l'asparagine peut fort bien être attribuée à une action bactérienne, d'autant plus que KIESEL n'a nullement vérifié la stérilité de ses liquides à la fin de l'expérience.

D'ailleurs, CHIBNALL ne croit pas à l'existence d'une asparaginase spécifique dans les végétaux supérieurs. Dans ses expériences, les tiges d'orge germées de 9 jours qui provoquent aussi bien l'hydrolyse de l'asparagine que celle de la glycylglycine, contiendraient une peptidase nommée « érepsine d'orge ». L'auteur la compare à l'érepsine intestinale du porc, qui est active sur l'asparagine.

Il résulte de toutes ces recherches que l'asparaginase est présente dans quelques Moisissures (*Aspergillus niger*, *Penicillium Camemberti*) et dans la Levure de bière.

Les végétaux supérieurs ne semblent pas être très riches en ferment ; à ce sujet, les résultats sont contradictoires.

L'asparaginase est un ferment très fragile, rapidement détruit en présence de l'eau et de l'oxygène de l'air, mais en l'absence d'asparagine. Elle n'agit qu'en milieu neutre ou faiblement alcalin avec un optimum situé à pH 8,4-8,6, et à une température optimum de 40°.

(34) CHIBNALL (A.-C.). *Loc. cit.*

C. — RECHERCHE DE L'ASPARAGINASE CHEZ LES BACTERIES

On a surtout étudié l'uréase. Peu de travaux ont été effectués sur l'asparaginase ; elle a pourtant été signalée en 1924 par SUPNIEWSKI⁽³⁵⁾ chez le *Bacillus pyocyaneus* et en 1932 par VIRTANEN et TARNANEN⁽³⁶⁾ dans le *Bacillus fluorescens liquefaciens*.

(35) SUPNIEWSKI (J.). *Biochem. Zeitsch.*, 1924, 154, 98.

(36) VIRTANEN (A.-J.) et TARNANEN (J.). *Loc. cit.*

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE PREMIER

RECHERCHE DE L'ASPARAGINASE ET ETUDE DE SON EVOLUTION DANS LE MYCELIUM DE DIVERS *ASPERGILLUS* DU *PENICILLIUM GLAUCUM* ET DE DIVERS MUCORINEES.

Nous nous sommes proposé de rechercher l'asparaginase et d'étudier son évolution au cours de la culture de diverses Moisissures.

On est ainsi amené à préparer des mycéliums d'âge différent, et à éprouver l'activité de ceux-ci sur l'asparagine. Pour que ces essais soient comparables entre eux, il est nécessaire d'opérer sur des mycéliums desséchés, à cause de la teneur en eau essentiellement variable des mycéliums simplement essorés. Il convient que tous les détails du *modus operandi* soient rigoureusement fixés pour que les expériences successives puissent être légitimement comparées entre elles.

Nous allons donc décrire successivement les diverses phases de la technique opératoire.

a) Préparation des milieux destinés à la culture (composition, stérilisation, répartition).

b) Préparation de la semence (conservation de la souche, âge de la semence, émulsion des spores).

c) Pratique des cultures destinées à donner le mycélium. Récolte et séchage du mycélium.

d) Action de la poudre fermentaire sur l'asparagine.

1° Composition du milieu d'hydrolyse (pH, tampon);

2° Concentration en asparagine;

3° Température, durée.

e) Dosage de l'ammoniaque formée (appareil, principe, technique).

f) Interprétation des résultats.

a) Préparation des milieux (composition, stérilisation, répartition.

Les mycéliums ont été obtenus par culture sur milieux liquides, dont la composition a varié avec chaque espèce étudiée; nous la donnerons au moment de l'étude de chacune d'elles.

Nous avons utilisé pour la préparation de ces milieux, des produits purs « pour analyse » PROLABO.

Les milieux sont répartis à la dose de 25 cc. dans des fioles coniques en pyrex de 150 cc. et stérilisés à l'autoclave à 115° pendant 15 minutes.

b) Préparation de la semence.

Les souches du Champignon nous ont été fournies par la mycothèque de la Faculté de Pharmacie. Elles sont maintenues vigoureuses par des repiquages fréquents sur carotte, et nous utilisons pour l'ensemencement des cultures de 8 jours.

L'ensemencement du milieu de culture est pratiqué au moyen d'une émulsion de spores, faite à raison de 10 anses de platine de spores pour 10 cc. de sérum physiologique stérile.

La température où se fait la culture, varie avec les espèces étudiées. Elle sera indiquée dans chaque cas.

**c) Pratique des cultures destinées à donner le mycélium.
Récolte et séchage du mycélium.**

Pour une série d'expériences, on ensemence une vingtaine de fioles; on en retire deux ou trois de l'étuve, aux divers jours de l'expérience, suivant les protocoles donnés dans chaque cas.

Le mycélium est exprimé et lavé soigneusement à plusieurs reprises à l'eau distillée, de façon à éliminer les dernières traces du milieu de culture; on l'exprime à la presse et on le sèche à l'étuve à 35° pendant 24 heures.

Il faut éviter de laisser trop longtemps le mycélium au contact de l'eau et de l'oxygène de l'air; dans ces conditions, l'asparaginase est rapidement détruite en l'absence d'asparagine (BACH).

La masse sèche est pulvérisée au mortier de verre, tamisée et conservée pour l'usage dans des ampoules scellées, à l'abri de la lumière.

d) Action de la poudre fermentaire sur l'asparagine.

- 1° Composition du milieu d'hydrolyse.
- 2° Concentration en asparagine.
- 3° Température. Durée.

1° COMPOSITION DU MILIEU D'HYDROLYSE.

On ne peut songer à utiliser de simples solutions aqueuses d'asparagine, qui ont une réaction acide. On sait, en effet, par les expériences de GEDDES et HUNTER, et par celles de BACH, que le pH optimum de l'asparaginase est en milieu neutre ou faiblement alcalin (pH 8,5). Il convient donc d'opérer à ce pH, en solutions fortement tamponnées, pour éviter les variations de réaction pendant l'hydrolyse

En fait, nous avons utilisé la solution-tampon déjà utilisée par BACH, et obtenue en mélangeant :

Borate de soude N/20	500 cc.
Phosphate monopotassique N/20	500 cc.

Le pH de cette solution, voisin de 8,5, a été mesuré à l'échelle colorimétrique de CLARK et LUBS.

2° CONCENTRATION EN ASPARAGINE.

On utilise l'asparagine à la concentration de 0,5 %, et la poudre fermentaire à la dose de 1 %, suivant les conditions fixées par BACH à propos de l'*Aspergillus niger*.

On opère toujours en présence d'un antiseptique : le toluène, et en flacons bien bouchés, pour éviter le départ de l'ammoniaque pendant l'hydrolyse; cette condition est essentielle.

Les opérations sont faites en double.

Chaque essai est accompagné de témoins. Les résultats que nous obtiendrons dans le dosage de l'ammoniaque, devront, en effet, subir deux sortes de corrections :

A. — Une correction due à l'ammoniaque apportée par la poudre fermentaire : lavages incomplets, présence de produits hydrolysables dans le mycélium. Un essai est donc fait dans les conditions ordinaires, mais sans asparagine.

B. — Une correction due à l'hydrolyse de l'asparagine par la chaleur seule, soit au cours du séjour à l'étuve, soit au cours de la distillation. On fait donc un témoin renfermant l'asparagine, sans poudre fermentaire, et soumis aux mêmes manipulations que les essais ordinaires.

Ce témoin peut servir pour toute une série d'expériences. Le premier est au contraire répété à chaque fois.

Les chiffres obtenus seront retranchés du résultat brut.

En conséquence, voici la disposition de chaque série de recherches :

	Essai		Témoins (asparagine)		Témoins (poudre)	
	1	2	3	4	5	6
Solution-tampon. . .						
pH 8,5 (1).....	15 cc.	15 cc.	15 cc.	15 cc.	15 cc.	15 cc.
Asparagine.	0 gr. 075	0 gr. 075	0 gr. 075	0 gr. 075		
Poudre fermentaire.	0 gr. 15	0 gr. 15			0 gr. 15	0 gr. 15
Toluène.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.

3° TEMPÉRATURE, DURÉE DE L'HYDROLYSE.

Nous avons utilisé comme enceinte thermique un thermostat à eau. On a toujours opéré à 38°, puisque cette température a été reconnue par BACH comme la température optimum d'action du ferment.

Les fioles y sont immergées jusqu'au col, après avoir été lestées avec une rondelle de plomb. La poudre fermentaire est ajoutée seulement quand l'équilibre de température est obtenu, et les temps sont comptés à partir de ce moment seulement.

L'opération dure habituellement 21 heures.

A la fin de l'essai, les fioles retirées du thermostat sont immergées dans de l'eau froide, ainsi la réaction est interrompue, car le ferment a une activité pratiquement nulle à froid. On filtre rapidement sur coton et soumet aussitôt le filtrat au dosage de NH_3 .

e) Dosage de l'ammoniaque formée.

1° PRINCIPE.

Le dosage de l'ammoniaque est pratiqué par entraînement à la vapeur d'eau, en présence d'un alcali faible. La distillation, qui porte généralement sur 5 ou 10 cc. de filtrat, dure 7 minutes. L'ammoniaque est reçue dans une solution d'acide

(1) On a quelquefois opéré sur 10 cc. de liquide seulement, les concentrations des divers produits restant rigoureusement les mêmes.

chlorhydrique N/20 et l'on titre par retour, l'acide qui n'a pas réagi, au moyen de l'eau de baryte environ N/20.

On utilise le rouge de méthyle comme indicateur.

2° DESCRIPTION DE L'APPAREIL (Fig. 1).

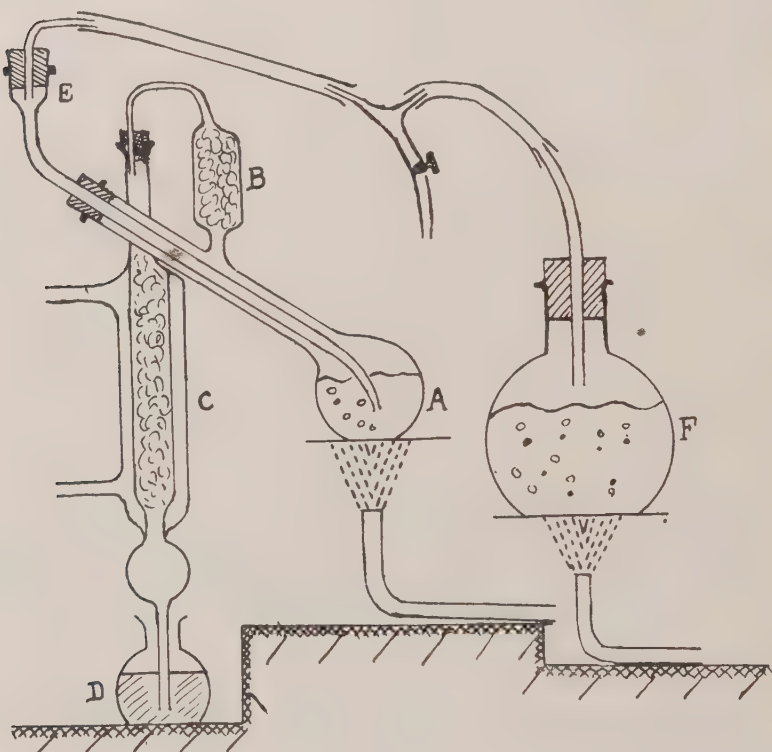


FIG. 1.

La partie essentielle de l'appareil est un petit ballon A, portant sur son col une tubulure reliée à une colonne rectificatrice de VIGREUX B, destinée à arrêter les particules liquides mécaniquement entraînées, et qui fausseraient gravement le dosage.

Ce dispositif est relié à un petit réfrigérant vertical C à pointes, moins encombrant que les réfrigérants à tube spiralé. Ce réfrigérant amène le liquide distillé dans le vase D où se fera le titrage.

Dans le ballon A pénètre par le goulôt un tube à entonnoir E destiné à amener au moment voulu la vapeur produite dans le grand ballon auxiliaire F.

3° TECHNIQUE.

On fait passer dans le ballon A, 5 ou 10 cc. de filtrat, 10 cc. d'une solution boratée de pH 9,4 et une goutte de solution alcoolique au 1/100 de phénolphthaléine, pour contrôler l'alcalinité du milieu. On relie aussitôt le ballon A au générateur de vapeur V.

On fait bouillir le liquide contenu dans le petit ballon A, l'ébullition étant maintenue avec une très petite flamme, et la distillation étant activée par le courant de vapeur d'eau qui passe dans l'essai.

Dans ces conditions, le passage de l'ammoniaque demande à peine 7 minutes. La pointe du réfrigérant doit plonger dans 5 ou 10 cc. d'acide chlorhydrique N/20, tout danger de perte d'ammoniaque est ainsi écarté.

On emploie comme indicateur le rouge de méthyle; il fournit des virages très nets entre pH 4,4 et pH 6, zone où l'ammoniaque n'exerce pas son effet tampon; le changement de teinte est précis à une goutte près.

Grâce à la rapidité de l'entraînement, l'hydrolyse des composés susceptibles de fournir de l'ammoniaque est réduite au minimum.

Au bout de 7 minutes, le contenu de la fiole D est porté à l'ébullition pour chasser le gaz carbonique. On refroidit en tenant la fiole fermée, et procède aussitôt au dosage de l'acide chlorhydrique en excès.

L'excès d'acide non combiné est titré au moyen de l'eau de baryte environ N/20. Cette solution doit être filtrée et titrée à chaque série de dosages.

L'eau de baryte présente l'immense avantage de ne pas être carbonatée, et de fournir des virages très nets. Avec les alcalis ordinaires (soude), malgré les précautions prises, l'alcali se carbonate, et en présence de CO_2 , le virage du rouge de méthyle est incertain (effet tampon de CO_2).

TITRAGE DE L'EAU DE BARYTE.

Dans une fiole conique, on introduit 5 cc. d'acide chlorhydrique N/20, 10 cc. d'eau distillée et V gouttes de rouge de méthyle. On porte à l'ébullition pour chasser le gaz carbonique dissous et l'on refroidit en récipient clos. On verse alors l'eau de baryte jusqu'à virage au jaune du rouge de méthyle.

Soit N le chiffre obtenu.

f) Calcul du pourcentage d'asparagine hydrolysée.

Soit n l'excès d'acide non combiné.

Comme l'eau de baryte n'est pas tout-à-fait N/20, le chiffre exact devrait être $\frac{5n}{N} = n'$.

A représente la quantité d'acide chlorhydrique N/20 destinée à saturer l'ammoniaque.

Le volume de l'acide consommé sera :

$$A - n' = B$$

Pour calculer le pourcentage de l'asparagine hydrolysée, il faut tenir compte des témoins et les retrancher de l'essai. Soit E ce chiffre corrigé.

Le poids moléculaire de l'asparagine hydratée est 150 ; les solutions d'asparagine, utilisées à 0,5 % sont donc N/30. On emploie dans la distillation, tantôt 10 cc. de filtrat, tantôt 5 cc.

Dans le premier cas, 10 cc. d'asparagine N/30 =
6,66 HCl N/20.

Dans le deuxième cas, 5 cc. d'asparagine N/30 =
3,33 HCl N/20.

Le pourcentage s'obtient par la relation :

$$1^{\circ} x = \frac{E \times 100}{6,66}$$

$$2^{\circ} x = \frac{E \times 100}{3,33}$$

CALCUL DU POIDS D'AMMONIAQUE FORMÉE EN MILLIGRAMMES.

Chaque centimètre cube d'acide chlorhydrique au vingtième normal saturé correspond à 0 mgr. 7 d'azote ammoniacal

$$P = E \times 0,7.$$

En possession de cette technique, nous l'avons appliquée à l'étude de divers Champignons inférieurs, à celle des Levures, puis à quelques Champignons supérieurs. Nous avons enfin étudié quelques Phanérogames et plusieurs Bactéries.

PERISPORIACEES

ASPERGILLUS FLAVUS. LINK

L'*Aspergillus flavus* pousse rapidement à 26° sur la solution utilisée par BACH pour la culture de l'*Aspergillus niger*.

Voici sa composition :

Sulfate d'ammonium	6 gr. 6
Peptone Chassaing	10 gr.
Chlorure de potassium	0 gr. 745
Phosphate acide de potassium	1 gr. 36
Sulfate de magnésium	0 gr. 492
Perchlorure de fer officinal.....	1 goutte
Sulfate de zinc	0 gr. 01
Saccharose	100 gr.
Eau distillée	Q. S. 100 cc.

Cette espèce donne un mycélium épais, recouvert d'un gazon conidien vert-jaunâtre.

On aensemencé une vingtaine de fioles. Le mycélium est déjà assez abondant au 2° jour pour être récolté. Les récoltes sont faites au 2°, 3°, 4°, 6°, 9° et 11° jour. Le tableau I résume les résultats obtenus.

La quantité d'asparagine hydrolysée est très grande dès le 2° jour. Elle baisse jusqu'au 6° jour, atteint un second maximum au 9° et disparaît progressivement.

La courbe représentée fig. 2 a la même allure que celle donnée par l'*Aspergillus niger* étudié par BACH.

TABLEAU I

Age du mycélium	HCl N/ 20 consommé par 10 cc.de filtrat			Poids d' NH_3 formée en mmgr.	Pourcentage asparagine hydrolysée
	Témoins (asparagine + poudre)	Essai	Chiffre corrigé		
2 jours	0,50	6,34	5,84	4,08	87,6
3 jours	0,32	3,18	2,86	2	42,9
4 jours	0,24	1,54	1,3	0,91	19,5
-	0,24	1,56	1,32	0,92	19,8
6 jours	0,16	1	0,84	0,58	12,6
-	0,16	0,96	0,80	0,56	12
9 jours	0,16	2,53	2,37	1,65	35,55
-	0,16	2,48	2,32	1,62	34,8
11 jours	0,07	0,54	0,47	0,32	7
-	0,07	0,52	0,45	0,31	6,7

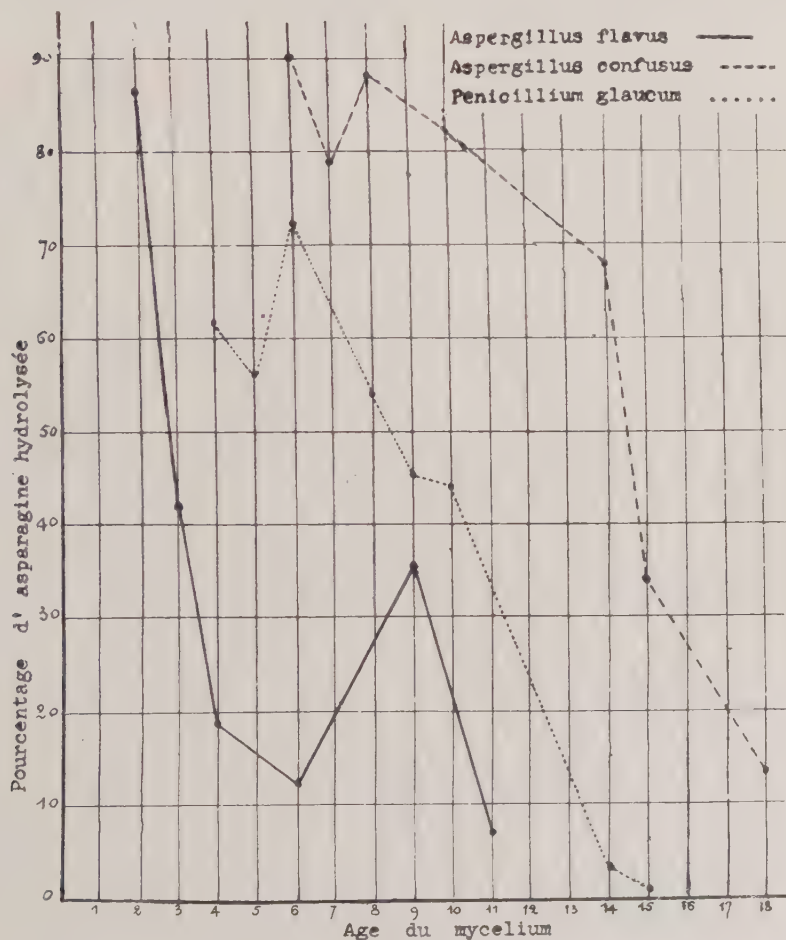


FIG. 2.

ASPERGILLUS 'REPENS DE BARY.

Cette espèce, qui a fait l'objet des études classiques de BACH, sur sa nutrition azotée, est cultivée à 27° sur le liquide suivant :

Décoction de carottes à 500 gr. pour 2000 cc...	1000 cc.
Constante minérale B (1).....	50 cc.
Glucose	50 gr.
Citrate de soude	20 gr.
Chlorure de sodium	20 gr.
HCl N	10 cc.

Le champignon pousse mal si la décoction n'est pas concentrée. Il faut faire bouillir les carottes coupées finement, au moins pendant 3 heures.

Dans ce liquide, le citrate sert de tampon; le chlorure de sodium a pour but d'augmenter la pression osmotique du milieu, nécessaire au développement de l'*Aspergillus repens*. L'addition d'acide chlorhydrique normal a pour but d'amener le pH aux environs de 6, pH optimum pour la germination des spores (BACH).

Le voile blanc organisé dès le 3^e jour se couvre bientôt de conidies vertes. On le récolte en quantité assez notable les 3^e, 4^e, 6^e, 8^e, 13^e et 15^e jours.

(1) Formule de la constante minérale B :

PO ₄ H ₂ K	13 gr. 6
Cl K	7 gr. 55
SO ₄ Mg	4 gr. 92
SO ₄ Zn	0 gr. 10
Cl ₆ Fe ₂	une goutte
Eau bidistillée	Q. S. 500 cc.

Le tableau II montre que la teneur en asparaginase, d'autant plus élevée que le mycélium est plus jeune, diminue régulièrement au fur et à mesure que la culture vieillit. La quantité d'asparagine hydrolysée est très forte dès les premiers jours de la culture, même au 4^e jour où l'on a pourtant observé un léger fléchissement. L'activité du mycélium est encore notable au 15^e jour (fig. 3, p. 37).

TABLEAU II

Age du mycélium	HCl N/ 20 consommé par 5 cc. de filtrat			Poids d' NH_3 formée en mmgr.	Pourcentage asparagine hydrolysée
	Témoins (asparagine + poudre)	Essai	Chiffre corrigé		
3 jours	0,16	3,06	2,9	2,03	87
-	0,16	3,07	2,91	2,03	87,3
4 jours	0,20	2,88	2,68	1,87	80,4
-	0,20	3,03	2,83	1,98	84,9
6 jours	0,12	3	2,88	2,01	86,4
-	0,12	3,08	2,96	2,07	88,8
8 jours	0,22	2,55	2,33	1,63	69,9
-	0,22	2,75	2,53	1,77	75,9
13 jours	0,24	1,67	1,43	1	42,9
-	0,24	1,88	1,64	1,14	49,2
15 jours	0,12	0,73	0,61	0,42	18,3
-	0,12	0,52	0,4	0,28	12

ASPERGILLUS CINNAMOMEUS.

Pour cette espèce, le milieu de culture utilisé est le suivant :

Glycocolle.	7 gr. 5
Constante minérale B.	50 cc.
Glucose	50 gr.
Eau distillée.	q. s. p. 1000 cc.

On ensemence environ 24 fioles; le mycélium formé à 26° est recueilli à partir du 3^e jour et jusqu'au 13^e jour. Il est recouvert d'un gazon conidien blanc; les conidiophores sont épars et de couleur cannelle.

Les résultats des recherches effectuées sur cette espèce sont résumés dans le tableau III.

Age du mycélium	HCl N/ 20 consommé par 5 cc. de filtrat			Poids d'NH ³ formée en mmgr.	Pourcentage asparagine hydrolysée
	Témoins (asparagine + poudre)	Essai	Chiffre corrigé		
3 jours	0,14	1,23	1,09	0,76	32,7
-	0,14	1,1	0,96	0,67	28,8
5 jours	0,22	0,45	0,23	0,16	6,9
-	0,22	0,44	0,22	0,15	6,6
6 jours	0,10	0,66	0,56	0,39	16,8
-	0,10	0,63	0,53	0,37	15,9
8 jours	0,10	0,89	0,79	0,55	23,7
9 jours	0,14	0,76	0,62	0,43	18,6
-	0,14	0,72	0,58	0,40	17,4
10 jours	0,16	0,57	0,41	0,28	12,3
-	0,16	0,67	0,51	0,35	15,3
12 jours	0,16	0,39	0,23	0,16	6,9
-	0,16	0,54	0,38	0,26	11,4
13 jours	0,12	0,16	0,04	0,02	1,2
-	0,12	0,2	0,08	0,05	2,4

TABLEAU III

D'après la fig. 3, on voit que l'*Aspergillus cinnamomeus* n'est pas très riche en asparaginase. Au bout de 3 jours, 32 % d'asparagine sont hydrolysés; le pourcentage diminue; au 8^e jour, le second maximum atteint 23 % seulement. L'asparaginase disparaît ensuite complètement.

Ce champignon est donc du type *Aspergillus niger*, mais il est doué d'une activité moins considérable.

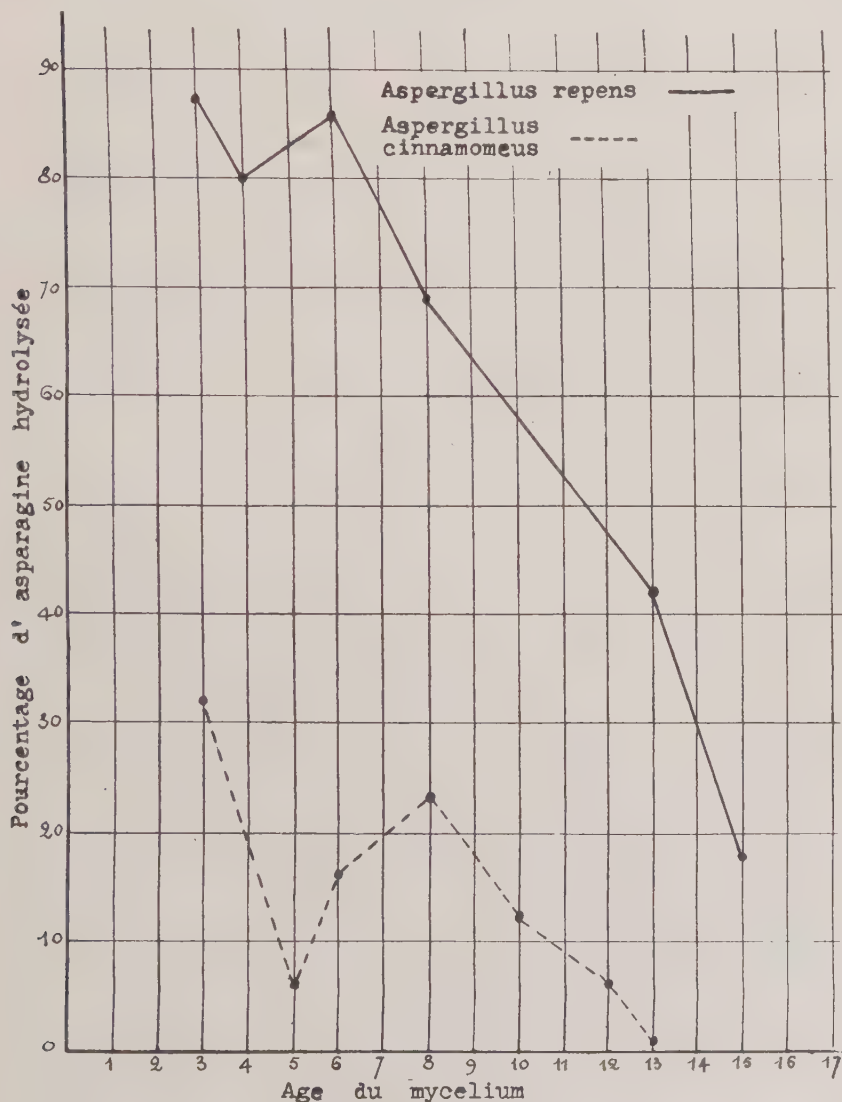


FIG. 3.

ASPERGILLUS NIDULANS WINTER.

Cette espèce est cultivée sur la solution suivante :

Sulfate d'ammonium	6 gr. 6
Peptone Chassaing	10 gr.
Constante minérale B.....	50 cc.
Saccharose	100 gr.
Eau distillée	Q. S. 1000 cc.

A 38°, le mycélium pousse rapidement; il est blanc et très dense; il donne de beaux périthèces rouges; mais les recherches effectuées n'y décèlent à aucune période la présence d'asparaginase. Cette expérience a été renouvelée, et a donné le même résultat négatif.

La culture est alors reprise à 24°, où le champignon pousse plus lentement, et se présente en îlots séparés, blancs, sans conidies ni périthèces.

Cette espèce est pathogène. Nous avons pris les mesures nécessaires pour éviter l'introduction de ses poussières dans les voies respiratoires pendant les manipulations du mycélium.

Le tableau IV montre que l'asparagine est faiblement hydrolysée avec l'*Aspergillus nidulans*. Le premier maximum, au 3^e jour, n'atteint que 33 %; le deuxième au 5^e jour est de 16 %. La courbe représentative de cette action (fig. 4, p. 41) tombe et se maintient ensuite vers zéro.

Cette expérience est intéressante à divers titres. Elle établit notamment que dans les cultures faites à haute température, ce qui représente pourtant l'optimum thermique de développement, l'asparaginase n'apparaît pas, ou plus probablement se détruit rapidement.

Ces faits appelleraient de nouvelles recherches.

TABLEAU IV

Age du mycélium	HCl N/ 20 consommé par 10 cc. de filtrat			Poids d' NH_3 formée en mmgr.	Pourcentage àsparagine hydrolysée
	Témoins (asparagine + poudre)	Essai	chiffre corrigé		
3 jours	0,18	2,43	2,25	1,57	33,7
-	0,18	1,95	1,77	1,23	26,5
4 jours	0,20	0,69	0,49	0,34	7,3
-	0,20	0,74	0,54	0,37	8,1
5 jours	0,10	1,23	1,13	0,79	16,9
-	0,10	1,28	1,18	0,82	17,7
6 jours	0,12	0,28	0,16	0,11	2,4
	0,12	0,17	0,05	0,03	0,75
7 jours	0,22	0,22	0	0	0
-	0,22	0,22	0	0	0
8 jours	0,10	0,14	0,04	0,02	0,6
-	0,10	0,11	0,01	0,007	0,15
13 jours	0,10	0,12	0,02	0,01	0,3
-	0,10	0,11	0,01	0,007	0,15
14 jours	0,12	0,12	0	0	0
	0,12	0,12	0	0	0

ASPERGILLUS ORYZÆ COHN.

Nous employons ici, à 24° de l'eau peptonée glucosée :

Peptone de Chassaing 20 gr.
 Glucose 50 gr.
 Eau 1000 cc.

Le mycélium est récolté au bout du 4^e jour; on prélève ensuite des fioles, les 5^e, 6^e, 8^e, 9^e, 13^e, 14^e et 17^e jours. Les voiles sont très blancs, abondants, sans gazon conidien.

Le tableau V résume les résultats obtenus. Au 4^e jour, 61 % d'asparagine sont hydrolysés; le pourcentage diminue, puis remonte au 8^e jour à 62 %. Le ferment disparaît ensuite progressivement.

TABLEAU V

Age du mycélium	HCl N/ 20 consommé par 10 cc.de filtrat			Poids d'NH ³ formée en mmgr.	Pourcentage asparagine hydrolysée
	Témoins (asparagine + poudre)	Essai	Chiffre corrigé		
4 jours	0,20	4,33	4,13	2,89	61,95
-	0,20	4,42	4,22	2,95	63,3
5 jours	1,06	4,16	3,1	2,17	46,5
-	1,06				
6 jours	1,12				
-	1,12	5,17	4,05	2,83	60,75
8 jours	0,82	5	4,18	2,92	62,7
-	0,82	4,96	4,14	2,89	62,1
9 jours	0,36	1,8	1,44	1	21,6
-	0,36	1,77	1,41	0,98	21,1
13 jours	0,36	0,97	0,61	0,42	9,1
-	0,36	0,93	0,57	0,39	8,5
14 jours	0,34	0,68	0,34	0,23	5,1
-	0,34	0,68	0,34	0,23	5,1
17 jours	0,42	0,71	0,29	0,20	4,3
-	0,42	0,69	0,27	0,18	4

La courbe représentative de cette action est donnée fig. 4.
Ce champignon est donc du type *Aspergillus niger*.

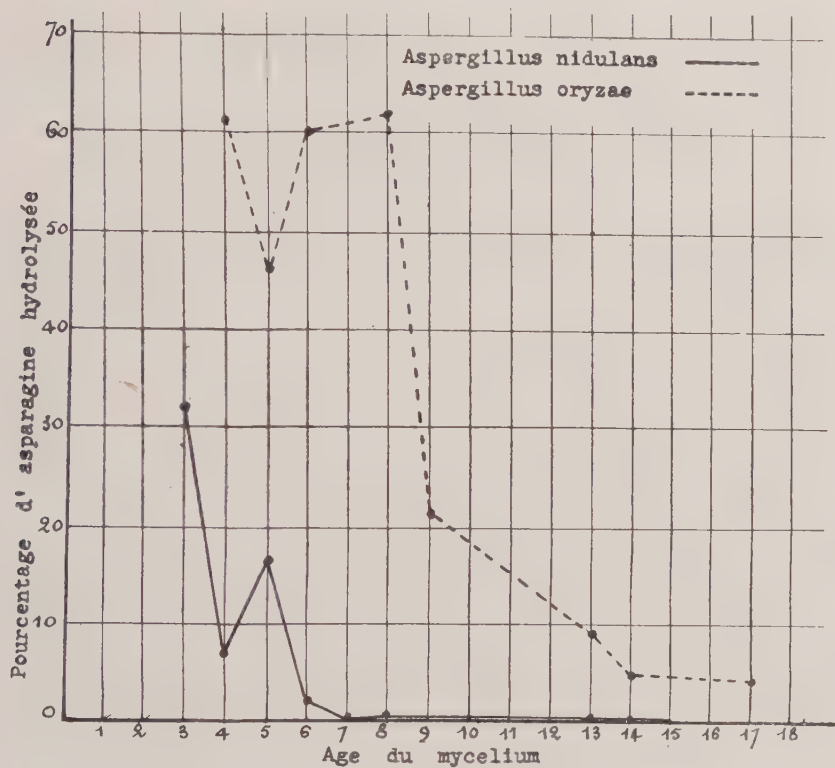


FIG. 4.

ASPERGILLUS CONFUSUS.

Cette espèce a été cultivée à 28° sur le milieu suivant :

Décoction de carottes à 500 gr. pour 2000 cc.	1000 cc.
Constante minérale B.....	50 cc
Glucose	50 gr.
Citrate de soude	20 gr.
Chlorure de sodium	20 gr.
HCl N	10 cc.

On ensemence une vingtaine de fioles; le champignon se développe très lentement, aussi ce n'est qu'à partir du 6^e jour que l'on commence à récolter le mycélium. Ces récoltes sont poursuivies jusqu'au 18^e jour.

Le tableau VI montre que de toutes les espèces que nous avons étudiées, celle-ci est la plus riche en asparaginase. Ses deux maxima atteignent 90 %. Au 14^e jour, plus de la moitié de l'asparagine est encore hydrolysée.

La courbe représentative de cette action est donnée fig. 2, (p. 33).

Ce champignon appartient donc encore au type *Aspergillus niger*. Il est remarquable de voir l'activité de cette espèce, bien que la culture soit très lente.

Ce fait appelle de nouvelles recherches.

TABLEAU VI

Age du mycélium	HCl N/ 20 consommé par 10 cc.de filtrat			Poids d' NH_3 formée en mmgr.	Pourcentage asparagine hydrolysée
	Témoins (asparagine + poudre)	Essai	Chiffre corrigé		
6 jours	1,08	7,12	6,04	4,22	90,6
-	1,08	7,12	6,04	4,22	90,6
7 jours	0,5	5,78	5,28	3,69	79,2
-	0,5	5,78	5,28	3,69	79,2
8 jours	0,9	6,79	5,89	4,12	88,35
-	0,9				
10 jours	0,82	6,35	5,53	3,87	82,95
-	0,82	6,36	5,54	3,87	83,1
14 jours	0,58	5,15	4,57	3,19	68,5
-	0,58	5,09	4,51	3,15	67,6
15 jours	0,92	3,21	2,29	1,6	34,3
-	0,92	3,16	2,24	1,56	33,6
18 jours	0,68	1,55	0,87	0,6	13
-	0,68	1,62	0,94	0,65	14,1

PENICILLIUM GLAUCUM LINK.

Ce champignon est ensemencé à 26° sur le milieu suivant :

Glycocolle	7 gr. 5
Glucose	50 gr.
Eau distillée	Q. S. 1000 cc.

Cette espèce donne au 4^e jour un mycélium dense, de teinte jaunâtre, à surface grossière et rugueuse, garni de conidies de couleur verte.

On continue les récoltes jusqu'au 15^e jour.

Le tableau VII montre qu'au bout du 4^e jour, le mycélium hydrolyse 62 % de l'asparagine. Le pourcentage baisse un peu et s'élève à 72 % au 6^e jour. Il y a donc ici, comme pour les *Aspergillus*, deux maxima. Au 9^e jour, 45 % d'asparagine sont encore hydrolysés; puis le ferment disparaît, comme le montre la courbe représentative de cette action (fig. 2).

TABLEAU VII

Age du mycélium	HCl N/ 20 consommé par 10 cc.de filtrat			Foids d' NH_3 fromée en mmgr.	Pourcentage asparagine hydrolysée
	Témoins (asparagine + poudre)	Essai	Chiffre corrigé		
4 jours	0,76	4,94	4,18	2,92	62,7
-	0,76	4,9	4,14	2,89	62,1
5 jours	0,36	4,12	3,76	2,63	56,4
-	0,36	4,09	3,73	2,61	55,95
6 jours	0,50	5,31	4,81	3,36	72,1
-	0,50				
8 jours	1,3	4,91	3,61	2,52	54,1
-	1,3	5	3,7	2,59	55,5
9 jours	1,26	4,27	3,01	2,1	45,1
-	1,26	4,2	2,94	2,05	44,1
10 jours	0,84	3,78	2,94	2,05	44,1
-	0,84	3,71	2,87	2	43
14 jours	0,28	0,48	0,2	0,14	3
-	0,28	0,49	0,21	0,14	3,1
15 jours	0,28	0,34	0,06	0,04	0,9
-	0,28	0,29	0,01	0,007	0,1

Conclusions

Les Périsporiacées provoquent la désamidation de l'asparagine ; néanmoins, comme dans le cas de l'*Aspergillus niger* Van Tieghem étudié par BACH, cette hydrolyse n'est jamais totale ; le mycélium de l'*Aspergillus confusus*, le plus riche en asparaginase, hydrolyse 90 % de l'asparagine mise en sa présence, dans les conditions optima de température, de concentration et de réaction.

Toutes les espèces étudiées sont actives. L'*Aspergillus confusus*, l'*Aspergillus flavus* Link, l'*Aspergillus repens* de Bary et le *Penicillium glaucum* Link sont les plus riches en ferment ; le mycélium de l'*Aspergillus oryzae* Cohn a une teneur moyenne ; celui de l'*Aspergillus cinnamomeus* est pauvre. L'*Aspergillus nidulans* Winter ne possède plus d'activité au bout du 7^e jour.

L'évolution du ferment s'accomplit toujours de la même façon ; la courbe représentative de chaque espèce présente deux maxima comme celle de l'*Aspergillus niger* Van Tieghem. Dans tous les cas, les mycéliums présentent leur premier maximum d'activité dès le premier jour de la récolte. Cette activité diminue nettement (*A. flavus* Link) ; elle ne varie guère chez l'*Aspergillus repens* de Bary ; puis elle atteint un second maximum ; elle décroît ensuite régulièrement pour disparaître, au fur et à mesure que le mycélium vieillit.

Pour toutes ces espèces, l'intérêt serait de connaître les variations d'activité de mycéliums obtenus à des températures différentes et sur des milieux de culture différents. L'asparaginase fait défaut dans le mycélium de l'*Aspergillus nidulans* Winter cultivé à 38°. A 24° l'activité du mycélium est faible, mais elle est appréciable jusqu'au 7^e jour.

MUCORINEES

CUNNINGHAMELLA ECHINULATA THAXTER

La culture se fait à 26° sur de l'eau peptonée glucosée :

Peptone de Chassaing	20 gr.
Glucose	50 gr.
Eau ..	1000 cc.

Cette moisissure blanche cultive très vite et très régulièrement. Le mycélium se développe d'abord sous forme d'une couche mince glaireuse, qui s'épaissit et devient sèche. Les conidies sont de couleur blanc grisâtre.

La récolte commence dès le troisième jour, elle se poursuit jusqu'au 13° jour.

Le tableau VIII résume les résultats obtenus ; cette espèce est peu riche en asparaginase. Le pourcentage d'asparagine hydrolysée n'atteint que 29 % au bout du 3° jour ; il diminue ensuite jusqu'à 2 %. Au 9° jour, il remonte à 7 % et s'annule au 11° jour.

La courbe représentative de cette action est donnée fig. 6, (p. 55).

TABLEAU VIII

Age du mycélium	HCl N / 20 consommé par 10 cc.de filtrat			Poids d' NH_3 formée en mmgr.	Pourcentage asparagine hydrolysée
	Témoins (asparagine + poudre)	Essai	Chiffre corrigé		
3 jours	0,4	2,35	1,95	1,36	29,25
-	0,4	1,99	1,59	1,11	23,85
4 jours	0,34	1,15	0,81	0,56	12,15
-	0,34	1,17	0,83	0,58	12,4
5 jours	0,24	0,51	0,27	0,18	4
-	0,24	0,46	0,22	0,15	3,3
6 jours	0,28	0,44	0,16	0,11	2,4
-	0,28	0,40	0,12	0,08	1,8
9 jours	0,46	0,99	0,53	0,37	7,95
-	0,46	0,92	0,46	0,32	6,9
11 jours	0,52	0,54	0,02	0,01	0,3
-	0,52	0,57	0,05	0,03	0,75
13 jours	0,58	0,63	0,05	0,03	0,75
-	0,58	0,59	0,01	0,007	0,15

RHIZOPUS REFLEXUS BAINIER.

Cette Mucorinée est cultivée à 25° sur le milieu suivant :

Décoction de carottes à 500 gr. pour 2000 cc.	1000 cc.
Constante minérale B.....	50 cc.
Glucose	50 gr.
Citrate de soude.....	20 gr.
Chlorure de sodium	20 gr.
HCl N	10 cc.

Onensemencé une vingtaine de fioles. La récolte commence le 3^e jour ; puis le mycélium est recueilli les 4^e, 5^e, 6^e, 7^e, 8^e, et 11^e jours.

Comme le montre le tableau IX, cette espèce est pauvre en ferment, surtout au début de sa culture. Le pourcentage d'asparagine hydrolysée atteint son deuxième maximum au 8^e jour : il n'est que de 16 % (fig. 5).

TABLEAU IX

Age du mycélium	HCl N / 20 consommé par 5 cc.de filtrat			Poids d'NH ₃ formée en mmgr.	Pourcentage asparagine hydrolysée
	Témoins (asparagine + poudre)	Essai	chiffre corrige		
3 jours	0,18	0,21	0,03	0,02	0,9
-	0,18	0,19	0,01	0,007	0,3
4 jours	0,14	0,32	0,18	0,12	5,4
-	0,14	0,32	0,18	0,12	5,4
5 jours	0,16	0,28	0,12	0,08	3,6
-	0,16	0,28	0,12	0,08	3,6
6 jours	0,28	0,60	0,32	0,22	9,6
-	0,28	0,56	0,28	0,19	8,4
7 jours	0,10	0,62	0,52	0,36	15,6
-	0,10	0,62	0,52	0,36	15,6
8 jours	0,10	0,66	0,56	0,39	16,8
-	0,10	0,64	0,54	0,37	16,2
11 jours	0,08	0,33	0,25	0,17	7,5
-	0,08	0,33	0,25	0,17	7,5

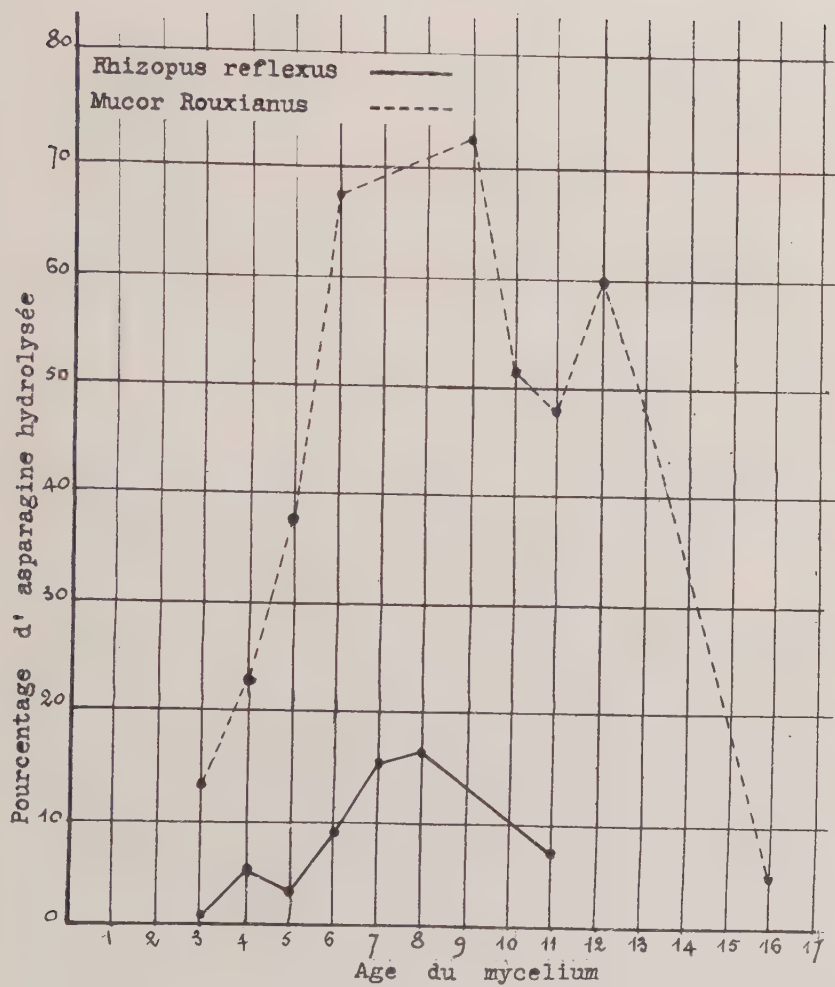


FIG. 5.

RHIZOPUS TRITICI SINENSIS SAITO.

Cette espèce est cultivée à 25° sur le milieu suivant :

Décoction de carottes 500 gr. pour 2000 cc.	100 cc.
Constante minérale B	50 cc.
Glucose	50 gr.
Citrate de soude	20 gr.
Chlorure de sodium	20 gr.
HCl N	10 cc.

Le mycélium blanc est recueilli au 3^e jour, jusqu'au 12^e. Il est peu abondant, et pousse en îlots séparés, qui se recouvrent plus tard de longs sporangiophores.

Cette Mucorinée est excessivement pauvre en asparaginase. Au début de sa culture, le pourcentage d'asparagine hydrolysée n'atteint que 5% (Tableau X).

Age du mycélium	HCl N / 20 consommé par 5 cc. de filtrat			Poids d'NH ₃ formée en mmgr.	Fourcentage asparagine hydrolysée
	Témoins (asparagine + poudre)	Essai	Chiffre corrigé		
3 jours	0,07	0,24	0,17	0,11	5,1
-	0,07	0,24	0,17	0,11	5,1
4 jours	0,08	0,26	0,18	0,12	5,4
-	0,08	0,26	0,18	0,12	5,4
6 jours	0,08	0,26	0,18	0,12	5,4
-	0,08	0,28	0,2	0,14	6
7 jours	0,14	0,3	0,16	0,11	4,8
-	0,14	0,3	0,16	0,11	4,8
8 jours	0,18	0,22	0,04	0,02	1,2
-	0,18	0,22	0,04	0,02	1,2
10 jours	0,08	0,29	0,21	0,14	6,3
-	0,08	0,29	0,21	0,14	6,3
12 jours	0,08	0,18	0,1	0,07	3
-	0,08	0,18	0,1	0,07	3

TABLEAU X

RHIZOMUCOR SEPTATUS.

Ce champignon pousse lentement à 25° sur le milieu suivant :

Décoction de carottes à 500 gr. pour 2000 cc.	1000 cc.
Constante minérale B	50 cc.
Glucose	50 gr.
Citrate de soude	20 gr.
Chlorure de sodium	20 gr.
HCl N	10 cc.

Cette espèce, récoltée du 4° jour au 14° jour ne renferme pour ainsi dire pas de ferment (Tableau XI).

Age du mycélium	HCl N / 20 consommé par 5 cc. de filtrat			Poids d' NH_3 formée en mmgr.	Pourcentage asparagine hydrolysée
	Témoins (asparagine + poudre)	Essai	Chiffre corrigé		
4 jours	0,04	0,06	0,02	0,01	0,6
-	0,04	0,06	0,02	0,01	0,6
5 jours	0,08	0,08	0	0	0
-	0,08	0,08	0	0	0
6 jours	0,12	0,16	0,04	0,02	1,2
-	0,12	0,16	0,04	0,02	1,2
8 jours	0,06	0,11	0,05	0,03	1,5
-	0,06	0,11	0,05	0,03	1,5
11 jours	0,1	0,2	0,1	0,07	3
-	0,1	0,22	0,12	0,08	3,6
14 jours	0,1	0,1	0	0	0
-	0,1	0,12	0,02	0,01	0,6

TABLEAU XI

ABSIDIA CŒRULEA BAINIER.

Les spores de cette Mucorinée sontensemencées à 26° sur de l'eau peptonée glucosée :

Peptone de Chassaing	20 gr.
Glucose ..	50 gr.
Eau ..	1000 cc.

Le tableau XII montre que cette espèce est pauvre en asparaginase. Le pourcentage d'asparagine hydrolysée monte à partir du 3^e jour et atteint 37 % au 4^e. Puis, le ferment disparaît peu à peu. Il n'y a qu'un maximum (fig. 6).

TABLEAU XII

Age du mycélium	HCl N/ 20 consommé par 5 cc. de filtrat			Poids d' NH_3 formée en mmgr.	Pourcentage asparagine hydrolysée
	Témoins (asparagine + poudre)	Essai	Chiffre corrigé		
3 jours	0,16	0,53	0,37	0,25	11,1
-	0,16	0,6	0,44	0,3	13,2
4 jours	0,16	1,4	1,24	0,86	37,2
-	0,16	1,11	0,95	0,66	28,5
6 jours	0,24	0,61	0,37	0,25	11,1
-	0,24	0,55	0,31	0,21	9,3
8 jours	0,12	0,24	0,12	0,08	3,6
-	0,12	0,17	0,05	0,03	1,5
10 jours	0,14	0,2	0,06	0,04	1,8
-	0,14	0,2	0,06	0,04	1,8
14 jours	0,1	0,17	0,07	0,04	2,1
-	0,1	0,17	0,07	0,04	2,1
15 jours	0,18	0,18	0	0	0
-	0,18	0,18	0	0	0

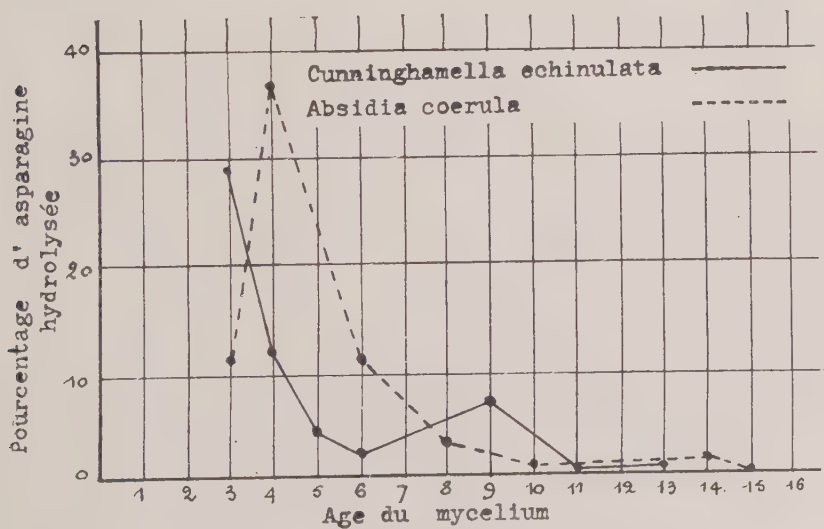


FIG. 6.

MUCOR ROUXIANUS WEHMER.

La culture se fait sur de l'eau peptonée glucosée, à 26°.

Peptone de Chassaing	20 gr.
Glucose ..	50 gr.
Eau ..	1000 cc.

On ensemente une vingtaine de fioles, et l'on récolte le mycélium du 3^e jour au 16^e.

Les résultats obtenus avec cette espèce sont donnés tableau XIII, et la courbe représentative (fig. 5; p. 51) montre que le *Mucor Rouxianus* hydrolyse fortement l'asparagine; le pourcentage croît sensiblement du 3^e jour au 9^e jour, où il atteint 72 %. Léger fléchissement les jours suivants; au 12^e jour, un second maximum se produit à 60 %. Au 16^e jour, l'hydrolyse est presque nulle.

TABLEAU XIII

Age du mycélium	HCl N/ 20 consommé par 5 cc. de filtrat			Poids d' NH_3 formée en mmgr.	Pourcentage asparagine hydrolysée
	Témoins (asparagine + poudre)	Essai	Chiffre corrigé		
3 jours	0,24	0,69	0,45	0,31	13,5
-	0,24	0,67	0,43	0,3	12,9
4 jours	0,1	0,86	0,76	0,53	22,8
-	0,1	0,88	0,78	0,54	23,4
5 jours	0,14	1,38	1,24	0,86	37,2
-	0,14	1,31	1,17	0,81	35,1
6 jours	0,12	2,38	2,26	1,58	67,8
-	0,12	2,37	2,25	1,57	67,5
9 jours	0,18	2,6	2,42	1,69	72,6
-	0,18	2,65	2,47	1,72	74,1
10 jours	0,18	1,9	1,72	1,2	51,6
-	0,18	1,94	1,76	1,23	52,8
11 jours	0,22	1,83	1,61	1,12	48,3
-	0,22	1,87	1,65	1,15	49,5
12 jours	0,24	2,26	2,02	1,41	60,6
-	0,24	2,16	1,92	1,34	57,6
13 jours	0,34	1,94	1,6	1,12	48
-	0,34	1,88	1,54	1,07	46,2
16 jours	0,3	0,49	0,19	0,13	5,7
-	0,3	0,41	0,11	0,07	3,3

CHÆTOSTYLUM CINEREUM.

Cette Mucorinée est cultivée à 26° sur de l'eau peptonée glucosée :

Peptone de Chassaing	20 gr.
Glucose	50 gr.
Eau	1000 cc.

On récolte le mycélium les 3°, 4°, 7°, 9°, 11° et 14° jours.

Le champignon hydrolyse 36 % d'asparagine au 3° jour ; puis le pourcentage diminue régulièrement et devient insignifiant au 7° jour. Cette espèce ne présente pas de second maximum (Tableau XIV).

Age du mycélium	HCl N/ 20 consommé par 5 cc.de filtrat			Poids d'NH ₃ formée en mmgr.	Pourcentage asparagine hydrolysée
	Témoins (asparagine + poudre)	Essai	Chiffre corrigé		
3 jours	0,1	1,3	1,2	0,84	36
-	0,1	1,42	1,32	0,92	39,6
4 jours	0,14	1,25	1,11	0,77	33,3
-	0,14	1,31	1,17	0,81	35,1
7 jours	0,06	0,37	0,31	0,21	9,3
-	0,06	0,36	0,3	0,21	9
9 jours	0,06	0,28	0,22	0,15	6,6
-	0,06	0,22	0,16	0,11	4,8
11 jours	0,12	0,22	0,1	0,07	3
-	0,12	0,2	0,08	0,05	2,4
14 jours	0,22	0,28	0,06	0,04	1,8
-	0,22	0,25	0,03	0,02	0,9

TABLEAU XIV

Conclusions

Les Mucorinées sont pauvres en asparaginase. Seul, le *Mucor Rouxianus* Wehmer se rapproche des Périsporiacées par sa teneur élevée en ferment qui, au 9^e jour, hydrolyse 72 % d'asparagine.

Jusqu'ici, tous les Champignons étudiés étaient d'autant plus riches en asparaginase que le mycélium est récolté plus jeune. Quelques Mucorinées (*Cunninghamella echinulata* Thaxter, *Chaetostylum cinereum*) suivent cette règle. Les autres se comportent différemment ; dans l'*Absidia cœrulea* Bainier, le *Rhizopus reflexus* Bainier, le *Mucor Rouxianus* Wehmer, le *Rhizopus tritici sinensis* Saito, les mycéliums les plus jeunes ne sont pas les plus actifs ; ce n'est qu'au 4^e jour par exemple que l'*Absidia cœrulea* produit la plus grande hydrolyse de l'asparagine. L'activité du *Mucor Rouxianus* croît du 3^e au 9^e jour.

Toutes les courbes représentatives de l'action des Mucorinées sur l'asparagine présentent deux maxima, sauf celles de l'*Absidia cœrulea* et du *Chaetostylum cinereum*. La première ne présente qu'un maximum ; la seconde est une droite.

CONCLUSIONS RELATIVES AUX PERISPORIACEES ET AUX MUCORINEES

L'asparaginase est présente chez les Périsporiacées et chez les Mucorinées.

Les *Aspergillus* sont de beaucoup les plus actifs; l'*Aspergillus confusus*, qui est l'espèce la plus riche en ferment, peut provoquer une hydrolyse de 90 %; un mycélium de 14 jours hydrolyse encore la moitié de l'asparagine mise en sa présence. Le *Mucor Rouxianus* Wehmer décompose 72 % d'asparagine au 9^e jour.

Par contre, les espèces les moins actives : *Aspergillus cinnamomeus* et *Aspergillus nidulans* Winter atteignent encore 35 % dans leur action sur l'asparagine.

Les Mucorinées les plus pauvres en ferment comme le *Rhizopus tritici sinensis* Saito et le *Rhizomucor septatus* fournissent une hydrolyse insignifiante, n'atteignant pas 7 %.

Si l'on range les Périsporiacées étudiées par ordre d'activité, on obtient la liste suivante (activités décroissantes) :

Aspergillus confusus.
Aspergillus repens de Bary.
Penicillium glaucum Link.
Aspergillus flavus Link.
Aspergillus oryzae Cohn.
Aspergillus cinnamomeus.
Aspergillus nidulans. Winter.

Avec les Mucorinées, on obtient :

Mucor Rouxianus Wehmer.
Absidia coerulea Bainier.
Rhizopus reflexus Bainier.
Cunninghamella echinulata Thaxter.
Chaetostylum cinereum.
Rhizopus tritici sinensis Saito.
Rhizomucor septatus.

Mais ce classement est artificiel et relatif, l'influence de la température et du milieu de culture pouvant modifier l'activité de chaque espèce.

Chez tous les *Aspergillus* étudiés, l'évolution du ferment s'accomplit telle que BACH l'a découverte chez l'*Aspergillus niger* Van Tieshem. La teneur en ferment, maximum au début de la culture diminue, passe par un minimum, puis remonte pour atteindre un nouveau maximum, qui correspond aux phénomènes de protéolyse se produisant dans un milieu de culture épuisé ; on assiste ensuite à la disparition progressive du ferment.

Chez les Mucorinées, sauf l'*Absidia cærulea* Bainier et le *Chaetostylum cinereum*, il se produit aussi deux maxima ; mais la teneur en ferment croît dès le début des cultures, pour atteindre son premier maximum au bout de quelques jours ; de sorte que la courbe d'hydrolyse n'a pas tout à fait la même allure.

Le *Cunninghamella echinulata* Thaxter se comporte en ce sens comme les Périsporiacées.

CHAPITRE II

RECHERCHE DE L'ASPARAGINASE ET ETUDE DE SON EVOLUTION DANS LES LEVURES

Nous avons d'abord vérifié la présence de l'asparaginase dans la Levure de boulangerie; puis nous avons étudié son action en fonction du pH de la solution-tampon, des concentrations en asparagine et en Levure, et de la durée de l'hydrolyse, de manière à fixer les conditions optima de son action et de son étude.

La levure fraîche est utilisée directement; il suffit de la délayer dans du sérum physiologique.

A. — Action du ferment en fonction du pH du milieu d'hydrolyse.

Comme les essais vont porter sur des solutions possédant des pH différents, on prépare d'abord un mélange de sels dont l'action stabilisante s'étend de pH 2 à pH 10. On l'obtient en utilisant les solutions-mères au cinquième normal, qui servent à préparer les échelles colorimétriques de CLARK et LUBS :

Solution de phtalate acide de potassium N/5.....	50 cc.
Solution de phosphate de potassium N/5.....	50 cc.
Solution d'acide borique N/5.....	50 cc.

On ajoute de la soude N/5 en quantités variables; on complète à 1.000 cc. avec de l'eau bidistillée. Les solutions obtenues possèdent les pH 6,3 - 7,3 - 8,7 et 9,7. On dissout 0 gr. 05

d'asparagine dans 10 cc. de chacune d'elles ce qui acidifie le milieu et fournit les pH suivants : 6,2 - 7,2 - 8,5 et 9,6.

2 gr. de levure fraîche sont émulsionnés dans 10 cc. de sérum physiologique. Le mélange renferme ainsi 10 % en poids de levure. La concentration en asparagine est de 0,25 %.

On opère toujours en présence de 2 cc. de toluène.

L'hydrolyse a lieu à 38° et dure 21 heures.

TABLEAU XV

p H	HCl N/ 20 consommé par 10cc.de filtrat			Poids d' NH_3 formée en mmgr.	Pourcentage asparagine hydrolysée (1)
	Témoins (asparagine + levure)	Essai	Chiffre corrigé		
6,2	0,54	0,57	0,03	0,02	0,9
-	0,54	0,59	0,05	0,03	1,5
7,2	0,56	0,99	0,43	0,3	12,9
-	0,56	1,03	0,47	0,32	14,1
8,5	0,58	2,33	1,75	1,22	52,5
-	0,58	2,4	1,82	1,27	54,6
9,6	0,54	0,67	0,13	0,09	3,9
-	0,54	0,63	0,09	0,06	2,7
	1) Les solutions d'asparagine, sont N/60 $x = E \times 30$				

Les résultats exprimés dans le tableau XV montrent que la désamidation de l'asparagine atteint son maximum à pH 8,5. L'asparaginase de la levure n'agit que faiblement en milieu trop acide ou trop alcalin.

B. — Action du ferment en fonction de la concentration en levure.

On utilise successivement 0 gr. 10 - 0 gr. 20 - 0 gr. 50 et 1 gr. de levure fraîche, ce qui donne les concentrations de 0,5 % - 1 % - 2,5 % et 5 %.

On opère dans les conditions optima de pH, c'est-à-dire à 8,5, suivant les résultats de l'expérience précédente.

TABLEAU XVI

Concentration en Levure	HCl N/ 20 consommé par 10 cc.de filtrat			Poids d' NH_3 formée en mgr.	Pourcentage asparagine hydrolysée
	Témoins (asparagine + Levure)	Essai	Chiffre corrigé		
0,5 % (0gr.10)	0,38	2,34	1,96	1,37	58,8
1 % (0gr.20)	0,44	3,18	2,74	1,91	82,2
2,5 % (0gr.50)	0,5	2,88	2,38	1,66	71,4
5 % (1gr.)	0,53	2,55	2,02	1,41	60,6

Les résultats, exprimés dans le tableau XVI montrent, qu'à partir d'une concentration en levure égale à 1 %, l'hydrolyse de l'asparagine semble diminuer. Plus la concentration en levure augmente, plus le pourcentage diminue.

La détermination du pH initial et du pH final du milieu d'hydrolyse fournit une explication à ce phénomène. Pour une concentration en levure de 1 %, le pH initial est 8,5 et le pH final 8,3; le milieu n'a donc pas varié sensiblement; mais pour une concentration en levure de 5 %, si le pH initial est 8,5, le pH final est 7,3; le milieu s'est donc acidifié sous l'action d'une plus grande quantité de levure.

Ceci explique pourquoi, dans le tableau XV, nous n'avions qu'une hydrolyse maximum de 52 % avec une concentration en levure de 10 %; dans le tableau XVI, l'hydrolyse atteint 60 % avec une concentration en levure de 5 %. Le maximum d'hydrolyse atteint 71 % avec 1 % de levure.

C. — Action du ferment en fonction de la concentration en asparagine.

On utilise ici 0 gr. 10 d'asparagine, ce qui donne une concentration de 0,5 %, et dans une seconde expérience 0 gr. 20, ce qui donne 1 %.

Le pH du milieu d'hydrolyse est 8,5.

La concentration de la levure est de 1 %.

TABLEAU XVII

Concentration en asparagine	HCl N / 20 consommé par 10 cc. de filtrat			Poids d' NH_3 formée en mmgr.	Pourcentage asparagine hydrolysée
	Témoins (asparagine +Levure)	Essai	Chiffre corrigé		
0,5 % (0gr.10)	0,22	5,42	5,2	3,64	78
1 % (0gr.20)	0,16	6	5,84	4,08	43,8

Dans le tableau XVII, on voit que la quantité d'asparagine hydrolysée n'est pas proportionnelle à sa concentration; au contraire, elle semble augmenter quand la concentration diminue.

Dans le tableau XVI, pour une concentration en asparagine de 0,25 %, et une concentration en levure de 1 %, l'hydrolyse atteint 82 %.

Le poids d'ammoniaque formée varie en sens inverse du pourcentage d'asparagine hydrolysée. Il augmente en même temps que la concentration en asparagine.

D. — Action du ferment en fonction de la durée de l'hydrolyse.

Concentration en asparagine	0,5 %
Concentration en levure	1 %
pH du milieu d'hydrolyse	8,5
Température du milieu.....	38°

TABLEAU XVIII

Durée de l'hydrolyse	HCl N/20 consommé par 10 cc. de filtrat			Poids d' NH_3 formée en mmgr.	Pourcentage asparagine hydrolysée
	Témoins (asparagine + Levure)	Essai	Chiffre corrigé		
1 heure	0,06	0,06	0	0	0
2 heures	0,11	0,11	0	0	0
3 heures	0,14	0,14	0	0	0
4 heures	0,14	0,23	0,09	0,06	1,3
5 heures	0,18	1,41	1,23	0,86	18,4
6 heures	0,22	1,7	1,48	1,03	22,2
16 heures	0,24	4,43	4,19	2,93	62,8
23 heures	0,28	5,16	4,88	3,41	73,2
48 heures	0,36	6,3	5,94	4,15	89,1
72 heures	0,39	6,27	5,88	4,11	88,2

Le tableau XVIII montre que l'hydrolyse de l'asparagine ne commence que vers la 4^e heure. Elle croît jusqu'à la 48^e heure, où elle est maximum et atteint 89 %. Elle n'a pas beaucoup varié à la 72^e heure, mais elle tend à diminuer.

Conclusions

La Levure fraîche de boulangerie renferme de l'asparaginase, dont l'activité maximum sur l'asparagine semble se produire dans un milieu d'hydrolyse, ni trop acide, ni trop alcalin, vers pH 8,5.

Une concentration trop forte en levure acidifie le milieu d'hydrolyse, et diminue l'action du ferment. A la concentration de 1 %, la levure donne son maximum d'hydrolyse.

La quantité d'asparagine hydrolysée n'est pas proportionnelle à sa concentration; elle augmente quand la concentration diminue.

L'asparaginase de la Levure peut hydrolyser 90 % d'asparagine au bout de 48 heures.

L'ASPARAGINASE DANS LES *SACCHAROMYCES*

A. — Préparation du milieu de culture.

Le milieu de culture est constitué par du moût de bière gélosé.

La solution de gélose est préparée avec 40 gr. d'agar-agar pour un litre d'eau.

L'agar-agar est coupé en petits morceaux et dissous dans un litre d'eau à 100°. Ce litre de gélose est mélangé à un litre de moût de bière; le tout est stérilisé à 120° pendant 15 minutes, et réparti dans de grandes fioles plates. Le moût de bière gélosé se prend en masse en refroidissant.

B. — Préparation de la semence.

Les *Saccharomyces* sont conservés en culture sur carotte ; on utilise pour l'ensemencement des cultures de 3 jours.

L'ensemencement du moût de bière gélosé est pratiqué au moyen d'une émulsion de cellules, faite à raison de 10 anses de platine de cellules pour 20 cc. de sérum physiologique stérile.

A l'aide d'une pipette Pasteur, on introduit dans chaque fiole quelques centimètres cubes de l'émulsion, et on la répartit aussitôt en nappe à la surface de la gélose, pour que la culture soit partout régulière.

L'étuve est réglée à 24° pour toutes les espèces étudiées.

C. — Récolte de la culture.

Pour chaque espèce de *Saccharomyces*, on ensemente une demi-douzaine de fioles ; on les retire une par une de l'étuve au jour fixé pour le dosage de chacune d'elles.

Pour récolter les cellules de levure qui adhèrent fortement à la surface de leur milieu de culture, il faut les détacher en les laissant en contact quelques minutes avec du sérum physiologique. Il faut prendre soin de ne pas décoller la gélose. On obtient ainsi une émulsion épaisse que l'on collecte avec une pipette Radais.

L'émulsion ainsi obtenue est centrifugée; on lave le culot de cellules avec du sérum physiologique, à trois reprises, par centrifugation.

Les cellules de levure, définitivement débarrassées des impuretés qu'elles pouvaient contenir, sont agitées avec 55 cc. environ de sérum physiologique, en présence de perles de verre. On obtient ainsi une émulsion très homogène que l'on divise en deux parties.

La première partie, 10 cc., sert à la préparation du tube-étalon.

La seconde est réservée pour le titrage.

D. — Technique du titrage.

a) TUBE-ÉTALON.

Pour chaque espèce de *Saccharomyces* étudiée, on prépare un tube-étalon, avec le produit de la première récolte.

Ce tube-étalon contient 10 cc. de l'émulsion obtenue ci-dessus et deux gouttes de formol. Il est scellé et tyndallisé à 60°.

On compare l'opacité de chaque prise d'essai, avant les dosages, à celle de ce tube.

b) TITRAGE.

On utilise l'asparagine à la concentration de 0,5 % dans la solution-tampon de pH 8,5. On prélève pour chaque dosage 10 cc. de l'émulsion de levures.

Le thermostat est réglé à 38°; la durée de l'hydrolyse est de 21 heures.

SACCHAROMYCES APICULATUS REESS.

Cultivée à 24° sur moût de bière gélosé, cette espèce donne, dès le 3^e jour, une nappe régulière de cellules que l'on peut récolter.

On fera d'autres récoltes les 4^e, 5^e, 6^e, 7^e et 8^e jours.

Le tableau XIX montre que le maximum d'hydrolyse est atteint au 4^e jour. Le ferment disparaît ensuite peu à peu. Donc ici, comme chez les Mucorinées, des cultures de 3 jours sont moins actives que celles de 4 jours.

TABLEAU XIX

Age de la Levure	HCl N/ 20 consommé par 10 cc. de filtrat			Poids d'NH ₃ formée en mmgr.	Pourcentage asparagine hydrolysée
	Témoins (asparagine + Levure)	Essai	Chiffre corrigé		
3 jours	0,12	2,45	2,33	1,63	34,95
-	0,12	2,46	2,34	1,63	35,1
4 jours	0,14	3,34	3,2	2,24	48
-	0,14	3,26	3,12	2,18	46,8
5 jours	0,19	2,44	2,25	1,57	33,75
-	0,19	2,41	2,22	1,55	33,3
6 jours	0,22	1,74	1,52	1,06	22,8
-	0,22	1,72	1,5	1,05	22,5
7 jours	0,22	1,25	1,03	0,72	15,4
-	0,22	1,15	0,93	0,65	13,9
8 jours	0,31	0,81	0,5	0,35	7,5
-	0,31	0,81	0,5	0,35	7,5

La courbe représentative de l'action du *Saccharomyces apiculatus* sur l'asparagine (fig. 7) ne présente qu'un maximum.

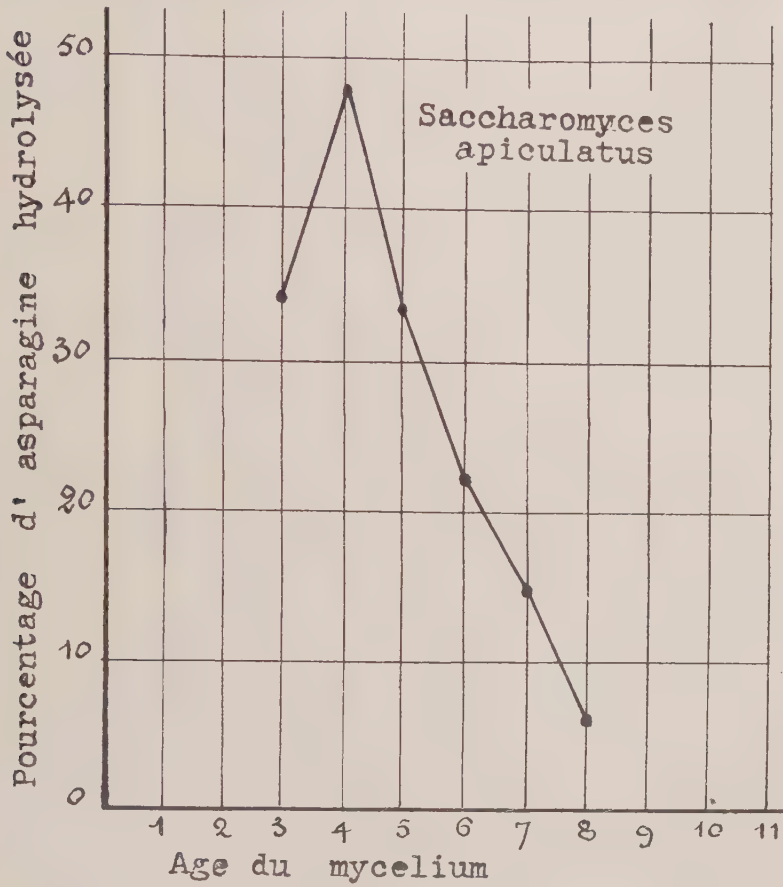


FIG. 7.

SACCHAROMYCES ELLIPSOIDEUS HANSEN.

Cette espèce est cultivée à 24° sur moût de bière gélosé; on récolte les cellules au 3° jour, puis, aux 4°, 5°, 6°, 10° et 14° jours.

Le tableau XX donne les résultats obtenus avec cette espèce. Au 3° jour, les levures sont moins actives qu'au 4°. L'asparaginase agit au maximum le 4° jour, puis elle diminue jusqu'au 14°. A cette époque, 22 % d'asparagine sont encore hydrolysés.

TABLEAU XX

Age de la Levure	HCl N/ 20 consommé par 10 cc.de filtrat			Poids d' NH_3 formée en mmgr.	Pourcentage asparagine hydrolysée
	Témoins (asparagine + Levure)	Essai	Chiffre corrigé		
3 jours	0,08	4,55	4,47	3,12	67
-	0,08	4,35	4,27	2,98	64
4 jours	0,1	4,92	4,82	3,37	72,3
-	0,1	5,1	5	3,5	75
5 jours	0,26	4,72	4,46	3,12	66,9
-	0,26	4,78	4,52	3,16	67,8
6 jours	0,18	4	3,82	2,67	57,3
-	0,18	3,97	3,79	2,65	56,8
10 jours	0,16	2,72	2,56	1,79	38,4
-	0,16	2,7	2,54	1,77	38,1
14 jours	0,21	1,69	1,48	1,03	22,2
-	0,21	1,72	1,51	1,05	22,6

Le *Saccharomyces ellipsoideux* est une espèce active. Tout comme le *Saccharomyces apiculatus*, il ne présente qu'un maximum (fig. 8).

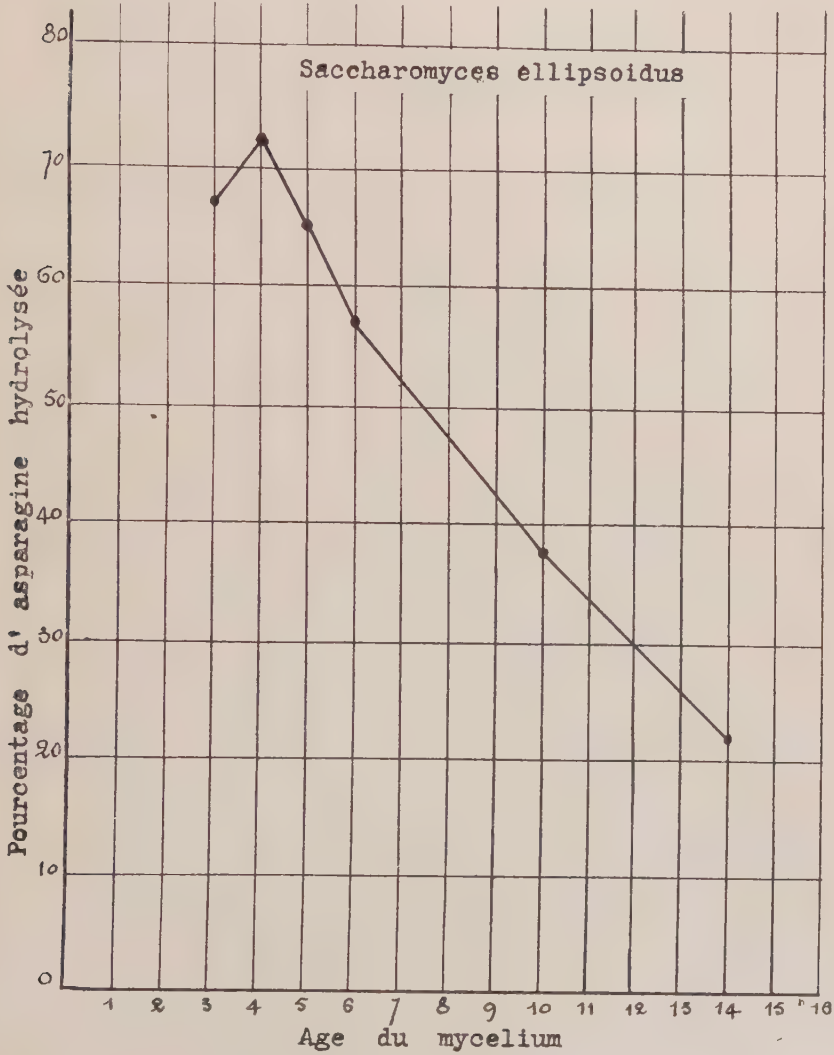


FIG. 8.

SACCHAROMYCES PASTORIANUS HANSEN.

Cette levure est cultivée à 24° sur du moût de bière gélosé. On recueille les cellules aux 3°, 5°, 6°, 9° et 15° jours.

Les résultats sont donnés dans le tableau XXI. Contrairement aux deux espèces précédentes, le *Saccharomyces Pastorianus* présente son maximum d'activité dès le 3° jour. Cette activité décroît ensuite jusqu'au 15° jour.

TABLEAU XXI

Age de la levure	HCl N/ 20 consommé par 10 cc.de filtrat			Poids d' NH_3 formée en mmgr.	Pourcentage asparagine hydrolysée
	Témoins (asparagine + Levure)	Essai	Chiffre corrigé		
3 jours	0,2	5,21	5,01	3,5	75,1
-	0,2	5,15	4,95	3,46	74,2
5 jours	0,16	3,23	3,07	2,14	46
-	0,16	3,39	3,23	2,26	48,4
6 jours	0,14	1,8	1,66	1,16	24,9
-	0,14	1,79	1,65	1,15	24,7
9 jours	0,16	0,53	0,37	0,25	5,5
-	0,16	0,52	0,36	0,25	5,4
15 jours	0,2	0,37	0,17	0,11	2,5
-	0,2	0,37	0,17	0,11	2,5

La courbe représentative de cette action (Fig. 9) est une droite.

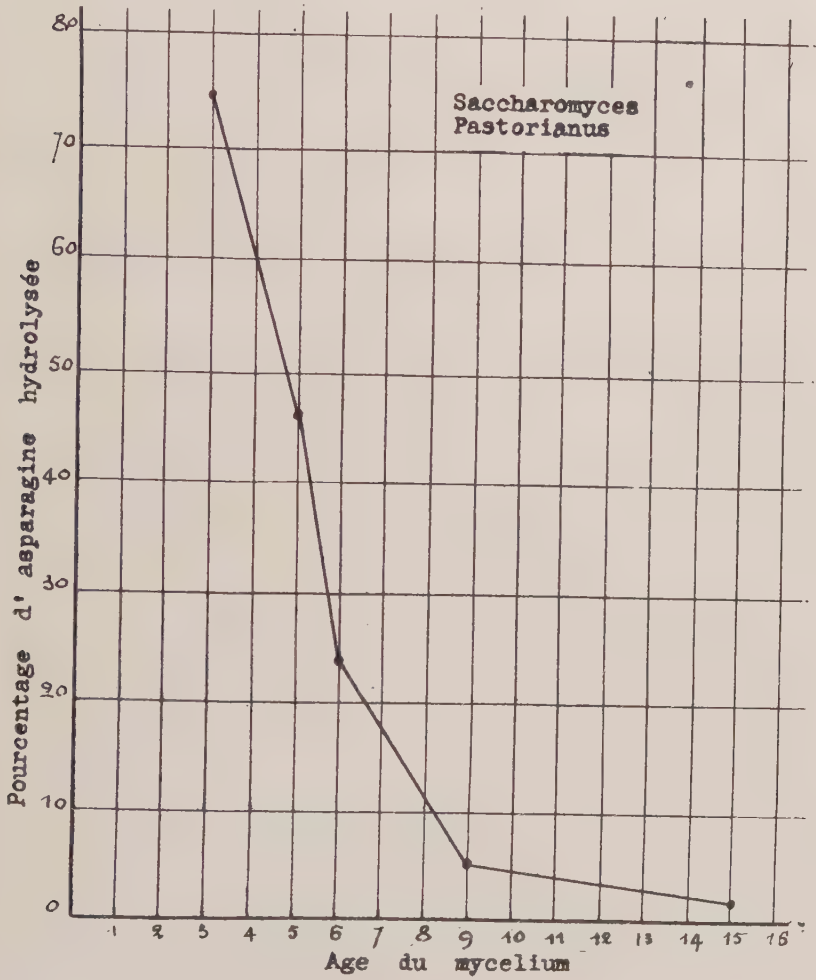


FIG. 9.

L'ASPARAGINASE DANS LES LEVURES DIVERSES

A. — ZYGOSACCHAROMYCES BISPORUS ANDERSON.

a) Un essai est fait, dans les conditions ordinaires, avec cette levure, récoltée au 3^e jour, sur moût de bière gélosé, à 24°. Il n'y a eu aucun dégagement d'ammoniaque au cours du dosage.

b) Avec la récolte du 4^e jour, on fait varier le pH du milieu d'hydrolyse; on opère à pH 6,2 - 7,2 - 8,5 et 9,6. Les résultats sont négatifs dans tous les cas.

c) Avec la levure de 5 jours, on fait varier la température du milieu d'hydrolyse. On abandonne une série de dosages à la température du laboratoire, pendant 21 heures; l'autre série est mise dans le thermostat à 38°. Les résultats sont encore négatifs.

B. — LEVURES DIVERSES.

Devant ces essais infructueux, d'autres levures sont récoltées, chacune à un âge différent. Traitées dans les conditions ordinaires, aucune ne donne un dégagement appréciable d'ammoniaque. Comme le montre le tableau XXII, ces levures ne renferment pas d'asparaginase.

TABLEAU XXII

Nom de la Levure	Age de la culture	HCl N/ 20 consommé par 10 cc. de filtrat			Poids NH ₃ en mmgr.	Pourcentage asparagine hydrolysée
		Témoins (asparagine + Levure)	Essai	Chiffre corrigé		
Schizosaccha- romyces octo- sporus Bei- jerinck	4 jours	0,10	0,4	0,3	0,21	4,5
		0,10	0,36	0,26	0,18	3,9
Zygosaccharo- myces bispo- rus Anderson	4 jours	0,36	0,36	0	0	0
		0,36	0,36	0	0	0
Debaryomyces Hudelo Da Fonseca	5 jours	0,32	0,59	0,27	0,18	4
		0,32	0,68	0,36	0,25	5,4
Sporobolomyces tenuis Kluyver	11 jours	0,09	0,09	0	0	0
		0,09	0,09	0	0	0
Nematospora Coryli Peglion	12 jours	0,09	0,11	0,02	0,01	0,3
		0,09	0,11	0,02	0,01	0,3

Conclusions

Tous les *Saccharomyces* étudiés sont riches en asparaginase. Il est curieux de constater que les seules espèces de levures qui ne renferment pas d'asparaginase appartiennent à un genre différent du genre *Saccharomyces*. Il y a là des recherches nouvelles à effectuer.

Le *Saccharomyces ellipsoideus* Hansen et le *Saccharomyces Pastorianus* Hansen sont riches en ferment; ils peuvent fournir une hydrolyse de 75 %. Le *Saccharomyces apiculatus* Reess n'atteint que 48 %. Néanmoins, ces valeurs ne sont que relatives, les tubes-étalons préparés pour chaque espèce ne peuvent pas être comparés entre eux.

La courbe représentative de l'action du *Saccharomyces ellipsoideus* et du *Saccharomyces apiculatus* sur l'asparaginase ne présente qu'un maximum. Sauf dans le cas du *Saccharomyces Pastorianus*, où la quantité de ferment est maximum dès le début de la récolte, au 3^e jour, les autres espèces ne présentent leur maximum qu'au 4^e jour.

CHAPITRE III

RECHERCHE DE L'ASPARAGINASE DANS LES CHAMPIGNONS SUPERIEURS

1° ESSAIS QUALITATIFS

Avant de commencer une étude sur l'asparaginase des Champignons supérieurs, nous avons effectué quelques essais préliminaires sur une soixantaine d'espèces, en suivant une technique comparable à celle qu'a suivie COSTY ⁽³⁷⁾ dans ses recherches sur l'uréase des Champignons.

Ces essais ont été effectués au cours de l'automne 1937.

Le champignon est traité aussi vite que possible après la récolte (pratiquement 3 à 4 heures); on le divise en petits morceaux et on l'introduit aussitôt à la dose de 0 gr. 50 dans des fioles coniques, renfermant déjà 15 cc. d'une solution d'asparagine à 1 %, préparée avec la solution-tampon de pH 8,5. Quelques centimètres cubes de toluène jouent le rôle d'antiseptique.

La fiole est bouchée hermétiquement; un papier de tournesol rouge, préalablement humecté d'eau distillée, plonge dans l'atmosphère de la fiole.

On prépare en même temps deux sortes de témoins. Le premier renferme la solution d'asparagine seule; on ne le fait qu'une fois pour toute la série d'expériences; le second renferme le champignon à étudier, sans asparagine.

(37) COSTY (P.). *Thèse Doct. Pharm.* Paris, 1923.

On place toutes les fioles à l'étuve à 38°; au bout de 20 heures, on observe le bleuissement plus ou moins intense du papier de tournesol.

a) Bleuissement intense

Helvella crispa (Scop.) Fr.
Lycoperdon Bull.
Amanita phalloides (Fr.) Quél.
Collybia butyracea (Bull.) Quél.
Mycena pura (Pers.) Quél.
Pholiota caperata (Pers.) Gill.
Cortinarius cinnamomeus (Linn.) Fr.
Boletus badius Fr.
Laccaria laccata (Scop.) Quél.
Agaricus silvicola.

b) Bleuissement moyen

Peziza aurantiaca Pers.
Armillaria mellea (Vahl.) Quél.
Tricholoma nudum (Bull.) Quél.
Tricholoma melaleucum (Fr.) Quél.
Tricholoma rutilans (Fr.) Quél.
Clitocybe nebularis (Batsch.) Quél.
Russula nigricans (Bull.) Fr.
Cortinarius torvus Fr.
Hypholoma fasciculare (Huds.) Quél.
Boletus erythropus Pers.
Fistulina hepatica Fr.
Polyporus versicolor Fr.
Hygrophorus conicus (Scop.) Fr.

c) Bleuissement faible

Amanita rubescens Pers.
Amanita citrina Pers.
Amanita pantherina D. C.

Lepiota procera (Scop.) Quél.
Lepiota excoriata (Schaeff.) Quél.
Tricholoma terreum (Schaeff.) Quél.
Tricholoma album (Schaeff.) Quél.
Tricholoma sulphureum (Bull.) Quél.
Clitocybe infundibuliformis (Scop.) Quél.
Clitocybe aurantiaca (Bull.) Quél.
Clitocybe cyathiformis (Fr.) Gill.
Lactarius blennius Fr.
Lactarius quietus Fr.
Lactarius theiogallus (Scop.) Fr.
Russula emetica Fr.
Russula atropurpurea Fr.
Russula delica Fr.
Panus stypticus (Bull.) Fr.
Cortinarius purpuraceus (Pers.) Fr.
Psalliota campestris Linn.
Paxillus involutus (Batsch.) Fr.
Stropharia æruginosa (Curt.) Quél.
Coprinus comatus Fr.
Coprinus atramentarius Fr.
Boletus aurantiacus Bull.
Polyporus frondosus Fr.
Merulus tremellosus Schrad.
Hydnum repandum Linn.
Craterellus cornucopioides (L.) Pers.

Conclusions

Cette méthode ne peut pas donner de résultats décisifs. Le témoin-champignon fournit parfois, malgré le toluène, un bleuissement aussi intense que celui de l'essai, parce qu'il se produit un début de fermentation ou de culture.

D'autre part, l'ammoniaque dégagée ne provient pas nécessairement de l'action de l'asparaginase sur l'asparagine introduite; Costy admet, en effet, la présence simultanée d'urée et

d'uréase dans certaines espèces de Champignons. Cette présence peut à elle seule expliquer le bleuissement du papier de tournesol.

2° ESSAIS QUANTITATIFS

On a recherché successivement l'asparaginase dans les Champignons frais et dans un liquide fermentaire, préparé selon la méthode de COSTY pour l'uréase.

a) A partir des Champignons frais

Les espèces étudiées sont les suivantes :

Boletus badius Fr. (entier).

Collybia butyracea (Bull) Quél. (entier).

Clitocybe cyathiformis (Fr.) Gill (lames, pied).

Lactarius blennius (Fr.) (lames).

La partie utilisée est hachée finement. On recherche l'asparaginase sur 0 gr. 50 de produit.

Voici la disposition de chaque série de recherches.

	Essai		Témoins (asparagine)		Témoins (champignon)	
	1	2	3	4	5	6
Solution-tampon						
pH 8,5	15 cc.	15 cc.	15 cc.	15 cc.	15 cc.	15 cc.
Asparagine	0 gr. 10	0 gr. 10	0 gr. 10	0 gr. 10		
Champignon	0 gr. 50	0 gr. 50			0 gr. 50	0 gr. 50
Toluène.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.

Le tableau XXIII montre que l'asparaginase fait défaut dans ces espèces. Le *Boletus badius* et le *Collybia butyracea* avaient

donné un bleuissement intense du papier de tournesol, au cours des essais qualitatifs. Ici, le dégagement d'ammoniaque est insignifiant.

Tous les essais sont rendus difficiles pendant la distillation, à cause de la formation d'une mousse abondante.

TABLEAU XXIII

Champignons étudiés	Partie utilisée	HCl N / 20 consommé par 10 cc. de filtrat			Poids d'NH ₃ formée en mmgr.	Pourcentage asparagine hydrolysée
		Témoins (asparagine + champignon)	Essai	Chiffre corrigé		
Boletus badius Fr.	entier	0,28	0,52	0,24	0,16	2,7
Collybia butyracea (Bull.) Quél.	entier	0,68	0,97	0,29	0,20	3,2
Clitocybe cyathiformis (Fr.) Gill	lames pied	0,20	0,53	0,33	0,23	3,7
		0,18	0,23	0,05	0,03	0,5
Lactarius blennius Fr.	lames	0,20	0,21	0,01	0,007	0,1

b) A partir d'un liquide fermentaire

Le chapeau du champignon est écrasé au mortier en présence de carbonate de chaux, dans la proportion de 10 %. On ajoute peu à peu un poids de glycérine égal à celui de la matière première; le tout est trituré pendant quelques instants et laissé en contact pendant 48 heures. Au bout de ce temps, on exprime à travers une étamine, et l'on filtre au papier mouillé.

La filtration est très longue; on est obligé de l'opérer à la glacière.

Ce liquide fermentaire est utilisé dans chaque essai, à la dose de 2 cc.

TABLEAU XXIV

Nom du Champignon	HCl N/ 20 consommé par 10 cc.de filtrat			Poids d' NH_3 formée en mmgr.	Pourcentage asparagine hydrolysée
	Témoins (asparagine +champignon)	Essai	Chiffre corrigé		
Boletus versipellis Fr.	1,12	1,14	0,02	0,01	0,1
Amanita moxaria (Linn.)	1,15	1,12	0,03	0,02	0,2
Russula delica Fr.	1,74	1,68	0,06	0,04	0,4
Lepiota (Quél.) procera (scop.)	1,09	1,09	0	0	0
Amanita citrina Pers.	0,18	0,18	0	0	0
Russula Fr. nigricans(Bull.)	0,27	0,22	0,05	0,03	0,3
Lepiota acutisquamosus	0,24	0,22	0,02	0,01	0,1
Hydnum repandum Linn.	0,16	0,08	0,08	0,05	0,6

Tous ces essais nous ont ainsi donné des résultats négatifs. Ils mériteraient sans doute d'être repris et étendus. D'ores et déjà, on peut penser que l'asparaginase est certainement moins répandue que l'uréase chez les Champignons supérieurs.

CHAPITRE IV

RECHERCHE DE L'ASPARAGINASE DANS LES GRAINES DE VEGETAUX SUPERIEURS

Si la répartition de l'uréase a été très longuement étudiée chez les végétaux supérieurs, il n'en est pas de même de l'asparaginase. Ce que l'on sait du métabolisme de l'asparagine dans les végétaux et de la corrélation entre la présence de l'enzyme et de son substrat, nous a conduit à faire porter nos recherches sur les graines germées et non germées.

1° Graines germées

Pour obtenir des plantules qui ne soient pas envahies par les bactéries ou les champignons filamenteux nous avons opéré comme suit :

Les graines sont désinfectées par un séjour d'une demi-heure dans l'alcool à 95°, puis lavées avec de l'eau stérile. Elles sont disposées sur de la mousse (*Sphagnum*) soigneusement lavée, puis rincée avec de l'eau stérile. On place le tout à l'étuve à 24°.

Quand la radicule a atteint un centimètre environ de longueur, on la sépare des cotylédons. On recherche l'asparaginase d'une part dans la radicule, de l'autre dans les cotylédons.

Chaque partie (radicules 3 gr. - cotylédons 5 gr.) est broyée séparément avec du sable, et délayée dans 50 cc. de sérum physiologique.

Chaque essai comporte :

	Essai		Témoins (asparagine)		Témoins (bactéries)	
	1	2	3	4	5	6
Solution-tampon pH 8,5	10 cc.	10 cc.	10 cc.	10 cc.	10 cc.	10 cc.
Asparagine	0 gr. 10	0 gr. 10	0 gr. 10	0 gr. 10		
Emulsion	10 cc.	10 cc.			10 cc.	10 cc.
Toluène	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Sérum physiologi- que			10 cc.	10 cc.		

Le tableau XXV montre que la radicule et les cotylédons des graines que nous avons étudiées, ne renferment pas de ferment hydrolysant l'asparagine.

2° Graines non germées

Deux expériences sont tentées avec la graine entière du Pois gris et celle du Potiron, pulvérisées, et mises en suspension dans du sérum physiologique. Il n'y a eu qu'un dégagement insignifiant d'ammoniaque : 0 mgr. 02 pour le Pois, 0 mgr. 06 pour le Potiron.

TABLEAU XXV

Graines	Partie employée	HCl N/20 consommé par 10 cc.filtrat			Poids d'NH ₃ formée en mmgr	Pourcentage asparagine hydrolysée
		Témoins (asparagine+graine)	Essai	Chiffre corrigé		
Lupin blanc	Radicule Cotylédons	0,14 0,26	0,19 0,29	0,05 0,03	0,03 0,02	0,75 0,45
Haricot blanc de Soissons	Rad. Cot.	0,18 0,22	0,18 0,23	0 0,01	0 0,007	0 0,15
Dolique asperge	Rad. Cot.	0,06 0,12	0,24 0,24	0,18 0,12	0,12 0,08	2,7 1,8
Pois Prince Albert	Rad. Cot.	0,16 0,32	0,17 0,32	0,01 0	0,007 0	0,15 0
Pois gris de printemps	Rad. Cot.	0,24 0,08	0,24 0,08	0 0	0 0	0 0
Fève de marais	Rad. Cot.	0,14 0,26	0,17 0,29	0,03 0,03	0,02 0,02	0,45 0,45
Vesce de printemps	Rad. Cot.	0,22 0,25	0,23 0,25	0,01 0	0,007 0	0,15 0
Lentille	Rad. Cot.	0,1 0,16	0,13 0,16	0,03 0	0,02 0	0,45 0
Vigna sinensis	Rad. Cot.	0,22 0,24	0,22 0,24	0 0	0 0	0 0
Soja hispida	Rad. Cot.	0,16 0,25	0,16 0,25	0 0	0 0	0 0
Melon	Rad. Cot.	0,14 0,24	0,16 0,24	0,02 0	0,01 0	0,3 0
Sophora japonica	Rad. Cot.	0,16 0,19	0,16 0,19	0 0	0 0	0 0
Phaseolus lunatus	Rad. Cot.	0,22 0,28	0,22 0,28	0 0	0 0	0 0
Mais dent de cheval	Rad. Cot.	0,16 0,12	0,17 0,15	0,01 0,03	0,007 0,02	0,15 0,45
Potiron dauphinois	Rad. Cot.	0,14 0,24	0,14 0,24	0 0	0 0	0 0

CHAPITRE V

RECHERCHE DE L'ASPARAGINASE DANS LES BACTERIES

Le milieu de culture est constitué par du bouillon gélosé, réparti dans de grandes fioles plates. On utilise pour l'ensemencement, des cultures bactériennes âgées de 3 jours.

L'ensemencement du bouillon gélosé est pratiqué au moyen d'une émulsion de bactéries, faite à raison de trois anses de platine pour 10 cc. de sérum physiologique stérile.

A l'aide d'une pipette Pasteur, on introduit l'émulsion dans la fiole, et on la répartit régulièrement à la surface du bouillon gélosé.

L'étuve est réglée à 37° pour les quatre espèces étudiées.

RECOLTE DE LA CULTURE

Au troisième jour de la culture, la surface de la gélose est lavée avec du sérum physiologique. L'émulsion ainsi obtenue est centrifugée ; on lave le culot de bactéries avec du sérum physiologique, à trois reprises, par centrifugation.

Les bactéries, définitivement débarrassées des impuretés qu'elles contenaient, sont agitées dans 50 cc. environ de sérum physiologique, en présence de perles de verre. On obtient ainsi une émulsion très homogène.

Les essais sont disposés comme suit :

	Essais		Témoins (asparagine)		Témoins (graines)	
	1	2	3	4	5	6
Solution-tampon pH 8,5	10 cc.	10 cc.	10 cc.	10 cc.	10 cc.	10 cc.
Asparagine	0 gr. 10	0 gr. 10	0 gr. 10	0 gr. 10		
Suspension	10 cc.	10 cc.			10 cc.	10 cc.
Sérum physiologi- que			10 cc.	10 cc.		
Toluène	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.

Le tableau XXVI donne les résultats de l'expérience. Dans les conditions données, on voit que le *colibacille* fournit une assez forte hydrolyse de l'asparagine. Le *Proteus vulgaris* et le *Bacillus pyocyaneus* seraient moins riches en asparaginase. Le *staphylocoque doré* est pauvre en ferment.

Ces valeurs ne sont que relatives ; les cultures de ces bactéries sont plus abondantes au troisième jour de leur récolte. Néanmoins, on peut conclure que les bactéries étudiées renferment de l'asparaginase.

TABLEAU XXVI

Nom ¹ des Bactéries	HCl N / 20 consommé par 10 cc. de filtrat			Poids d' NH_3 formée en mmgr.	Pourcentage asparagine hydrolysée
	Témoins (asparagine +bactéries)	Essai	Chiffre corrigé		
Proteus vulgaris	0,08	1,84	1,76	1,23	26,4
	0,08	1,88	1,8 "	1,26	27
Staphylo- coque doré	0,16	0,26	0,1	0,07	1,5
	0,16	0,26	0,1	0,07	1,5
Coli- bacille	0,38	3,55	3,17	2,21	47,5
	0,38	4,12	3,74	2,61	56,1
Bacillus pyocyaneus	0,06	0,79	0,73	0,51	10,9
	0,06	0,83	0,77	0,53	11,5

CONCLUSIONS GENERALES

Les recherches poursuivies conduisent aux résultats suivants :

1° Tous les *Aspergillus* étudiés renferment de l'asparaginase. L'*Aspergillus confusus*, l'*Aspergillus repens* de Bary, le *Penicillium glaucum* Link provoquent une forte scission de l'asparagine, mais dans tous les cas, cette hydrolyse n'est jamais totale. L'*Aspergillus nidulans* est une espèce très pauvre, qui ne possède plus d'activité au septième jour.

L'évolution du ferment s'accomplit de la même façon que chez l'*Aspergillus niger* Van Tieghem étudié par BACH. La courbe représentative de l'action de chaque espèce sur l'asparagine présente deux maxima, avec un premier maximum dès le premier jour de la récolte.

2° Les Mucorinées étudiées sont pauvres en asparaginase, si l'on en excepte le *Mucor Rouxianus* Wehmer. Il est à remarquer que certaines espèces telles : l'*Absidia cœrulea* Bainier, le *Rhizopus reflexus* Bainier, le *Mucor Rouxianus* Wehmer, le *Rhizopus tritici sinensis* Saito, ne présentent pas leur premier maximum au début de la récolte, mais quelques jours après.

L'*Absidia cœrulea* Bainier et le *Chaetostylum cinereum* ne présentent qu'un maximum.

3° La Levure de boulangerie est riche en ferment, mais il faut la faire agir dans des conditions bien déterminées :

a) Le maximum d'activité se produit dans un milieu d'hydrolyse qui possède un pH de 8,5.

b) La levure doit être employée à la concentration de 1 % pour donner le plus fort dégagement d'ammoniaque. Une con-

centration plus élevée acidifie le milieu d'hydrolyse et diminue l'action du ferment.

c) A la quarante-huitième heure, le maximum d'activité est atteint. Au bout de 72 heures, le dégagement d'ammoniaque est presque aussi élevé, mais il tend à diminuer.

4° Les *Saccharomyces* étudiés renferment de l'asparaginase. La courbe représentative de leur action sur l'asparagine ne présente qu'un maximum.

Quelques espèces n'appartenant pas au genre *Saccharomyces* ont été étudiées. Elles ne renferment pas d'enzyme.

5° On n'a pas pu déceler la présence d'un ferment agissant sur l'asparagine chez les Champignons supérieurs étudiés.

6° Les quelques graines étudiées nous ont fourni des résultats négatifs, qu'il s'agisse de graines au repos ou de graines germées de 4 jours.

7° Par contre, les Bactéries étudiées hydrolysent très bien l'asparagine mise en leur présence. Le *Colibacille* est riche en ferment. Le *Proteus vulgaris* et le *Bacille pyocyane* sont moins actifs. Le *Staphylocoque doré* n'a pas donné un grand dégagement d'ammoniaque.

Vu : *Le Président de la Thèse,*

D. BACH.

Vu : *Le Doyen de la Faculté,*

A. DAMIENS.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

G. ROUSSY.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- ABDERHALDEN (E.) und BERGELL (P.). — Der Abbau der Peptide in Organismus. *Zeitsch. f. physiol. Chem.* 1903, **39**, 9.
- ABDERHALDEN (E.) und RONA (P.). — Die Zusammensetzung des « Eiweisz » von *Aspergillus niger* bei verschiedener Stickstoffquelle. *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, 1905, **46**, 179.
- ABDERHALDEN (E.) und SCHITTENHELM (A.). — Die Wirkung der proteolytischen Fermente keimender Samen des Weizens und der Lupinen auf Polypeptide. *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, 1906, **49**, 26.
- ANDERSEN (A. C.) und RØED-MÜLLER (R.). — Zur Kenntnis der Eiweisskörper zur Bestimmung der Monoaminodicarbonsäuren. *Biochem. Zeitsch.*, 1916, **73**, 326.
- ARNHEIM (J.). — Beiträge zur Kenntnis der Autolyse. *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, 1903-1904, **40**, 234.
- AUBEL. — Recherches biochimiques sur la nutrition du *B. pyocyanique*, Laurier, Caen-Paris, 1921.
- BACH (D.). — Contribution à l'étude de la nutrition azotée de l'*Aspergillus repens* de Bary. *Thèse Doct. Sciences*, Paris, 1925.
- La nutrition azotée des Mucorinées. Assimilation de l'ion nitrique. *C. R. Acad. Sc.*, 1927, **184**, 1578.
- La nutrition azotée des Mucorinées. Assimilation des sels ammoniacaux. *C. R. Acad. Sc.*, **184**, p. 766.
- Influence du point isoélectrique de l'asparagine sur son hydrolyse par les acides et par les alcalis. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1928, **35**, 93.
- L'évolution de l'asparaginase dans les cultures de l'*Aspergillus niger*. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1929, **11**, n° 8, 995-1006.
- Evolution de l'uréase dans les cultures de l'*Aspergillus niger*, *Ibid.*, p. 1007-1015.
- L'uréase et l'asparaginase de l'*Aspergillus niger* sont-elles des endo-diestases, *Ibid.*, p. 1016-1024.
- Etude de l'hydrolyse fermentaire de l'asparagine par le mycélium de l'*Aspergillus niger*. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1929, **11**, 119-145.

- Sur quelques conditions d'action de l'uréase de l'*Aspergillus niger*. *C. R. Soc. Biol.*, 1929, **100**, 831.
- De l'emploi des mycéliums de Mucédinées dans les recherches de physiologie végétale. La méthode des voiles solides. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934, **16**, 1708.
- BAUMANN (E.) und WOLKOW (M.). — Ueber das Wesen der Alkaptonurie. *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, 1891, **15**, 1891.
- BEIJERINCK (M. W.). — Anhäufungsversuche mit Ureumbakterien. Ureumspaltung durch Urease und durch Katabolismus. *Zentralbl. für Bakt.*, 1901, **7**, 2, 33.
- BERGELL (P.) und VON WÜLFING (H.). — Ueber Verbindungen von Aminosäuren und Ammoniak. *Zeitsch. für physiol. Chem.*, 1910, **64**, 348.
- BERTEL. — Ueber Tyrosinablauf in Keimpflanzen. *Berichte der d. botan. Gesellschaft*, 1902, **20**, 460.
- BIOURGE (Ph.). — Les moisissures du groupe *Penicillium* Link. *La cellule*, 1923, **33**, 1^{er} fasc.
- BORODIN. — Ueber die physiologische Rolle und die Verbreitung des Asparagins in Pflanzenreiche. *Botan. Zeit.*, 1878, **36**, n^{os} 51-52, 801-832.
- BOSSHARD. — Ueber Ammoniakbestimmung in Pflanzensäften und Pflanzenextracten *Zeitsch. f. analyt. Chem.*, 1883, **22**, 329.
- BRIDEL (M.) et ARNOLD (R.). — Sur l'emploi de divers agents de précipitation de l'émulsine des amandes. *Journ. Ph. et Ch.*, 1921, 7^e Sér., **23**, 161-168.
- BUTKEWITSCH (Wl.). — Umwandlung der Eiweissstoffe durch die niederen Pilze im Zusammenhange mit einigen Bedingungen ihrer Entwicklung. *Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik*, 1902-03, **38**, 147.
- Die Umwandlung der Eiweissstoffe in verdunkelten grünen Pflanzen. *Bioch. Zeitschr.*, 1908, **12**, 314.
- Das Ammoniak als Umwandlungsprodukt stickstoffhaltiger Stoffe in höheren Pflanzen. *Bioch. Zeitschr.*, 1909, **16**, 411-437.
- CASTORO (N.). — Ueber das Vorkommen von Ammoniak in Keimpflanzen und über seine Bildung bei Autolyse solcher Pflanzen. *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, 1909, **50**, 525.
- CHIBNALL (A. C.). — Investigations on the nitrogenous metabolism of the higher plants. The distribution of nitrogen in the leaves of the runner bean. *Biochem. Journ.* 1922, **16**, 344.
- Distribution of nitrogen in the dead leaves of the runner bean, *Ibid.*, p. 608.
- Investigations on the nitrogenous metabolism of the higher plants, *Ibid.*, 1924, **18**, 395.

- CLEMENTI (A.). — Contributo alla conoscenza dei caratteri biochimici dell'aminoglicosio. *Arch. di Farm. sper.*, 1918, **25**, I, 225.
- Sulla deamidazione enzimatica dell' asparagina in diverse specie animali. *Rend. Acc. Lincei*, 1921, **30**.
- Ulteriori ricerche sulla deamidazione enzimatica dell' asparagina. *Rend. Acc. Lincei*, 1922, **31**.
- Sul significato fisiologico della presenza dell' asparaginasi nell' organismo animale. *Arch. di Farm. sper.*, 1926, **41**, 241.
- La concentrazione idrogenionica optimum per l'attività enzimatica dell' asparaginasi animale. *Bull. Soc. biol. sper.*, 1929, **4**, 200-202.
- CLEMENTI (A.) e CANTAMESSA (G.). — Le leggi che regolano la deamidazione enzimatica dell' asparagina. *Gazz. chim. ital.*, 1924, **54**, 781.
- COSTY (P.). — Uréase et urée chez les Champignons supérieurs. *Thèse Doct. Pharm.*, Paris, 1923.
- COUPIN (H.). — Sur la nutrition carbonée d'une Mucorinée, le *Rhizopus nigricans*. *C. R. Ac. Sc.*, 1928, **186**, 251.
- Sur la nutrition carbonée du *Penicillium glaucum* à l'aide de divers composés organiques de la série grasse. *C. R. Ac. Sc.*, 1926, **184**, 1575.
- CZAPEK (F.). — Untersuchungen über die Stickstoffgewinnung und Eiweissbildung der Pflangen. *Beitr. zur Chem. Physiol.*, 1901-02, **1**, 538.
- Untersuchungen über die Stickstoffgewinnung und Eiweissbildung der Schimmelpilze. *Beitr. zur Chem. Physiol.*, 1902, **2**, 557.
- DAVIS (L.) and MERKER (H. M.). — Studies on Pepsin; chemical changes in the purification of Pepsin. *Journ. of the American chem. Soc.*, 1919, **41**, I, 221.
- DERNBY (K. G.). — Studien über die proteolytischen Enzyme der Hefe und ihre Beziehung zu der Autolyse. *Bioch. Zeitschr.*, 1917, **81**, 107-208.
- DIETER (W.). — Ueber das Spaltungssurmögen der Hefe gegenüber Säure amidén. *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, 1922, **120**, 281.
- DOX (A. W.). — The intracellular enzymes of laver fungi, especially those of *Penicillium Camemberti*. *Journ. biol. Chem.*, 1909, **6**, 461.
- EFFRONT (J.). — Action de la levure de bière sur les acides amidés. *C. R. Ac. Sc.*, 1908, **146**, I, 779.
- FOLIN (O.). — Eine neue Methode zur Bestimmung des Ammoniaks in Harne und anderen thierischen Flüssigkeiten. *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1902-03, **37**, 161.
- FORBES (J.-C.). — The purification of pepsin, its properties and physical characters. *Journ. biol. Chem.*, 1926, **71**, 559.

- FOSSE (R.). — Présence simultanée de l'urée et de l'uréase dans le même végétal. *C. R. Ac. Sc.* 1914, **158**, 1374.
- FÜRTH (O. V.) und FRIEDMANN (M.). — Ueber die Verbreitung asparaginspaltender Organfermente. *Bioch. Zeitschr.*, 1910, **26**, 435.
- GEDDES (W. F.) and HUNTER (A.). — Observations upon the enzyme Asparaginase. *Journ. biol. Chem.*, 1928, **77**, 197.
- GONNERMANN (M.). — Ueber die Verseifbarkeit einiger Säureimide (Diamide) und Aminsäuren durch Fermente. *Arch. ges. Physiol.*, 1903, **95**, 278.
- GRASSMANN (W.) und MAYR (O.). — Zur Kenntniss der Hefeasparaginase. *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, 1933, **214**, 185.
- GROVER (C. E.) and CHIBNALL (A. C.). — The enzymic deamidation of asparagine in the higher plants. *Biochem. Journ.*, 1927, **21**, 857.
- GUILLIERMOND (A.). — Clef dichotomique pour la détermination des Levures.
- GÜNTHER (G.) und WAGNER (J.). — Ueber das Amidspaltungsvermögen der Hefen. *Bioch. Zeitschr.*, 1932, **254**, 1.
- HENRICI (A. T.). — Molds, Yeasts and Actinomycetes. New-York, édit. John Wiley and Sons, 1930.
- HOLZBERG (H. L.). — A new method of isolating Trypsin. *Journ. biol. Chem.*, 1913, **14**, 335-339.
- HOPKINS (R. H.). — The proteolytic enzymes of green malt. Adsorption and elution. *Biochem. Journ.*, 1929, **23**, II, 1022.
- HORODYNSKI (W.), SALASKIN (S.) und ZALESKI (J.). — Ueber die Vertheilung des Ammoniaks im Blute und den Organen normaler und hungernder Hunde. *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1902, **35**, 246.
- JACOBY (M.). — Ueber die fermentative Eiweisspaltung und Ammoniakbildung in der Leber. *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1900, **30**, 149.
- Ueber Harnstoffspaltung durch Bakterien. *Biochem. Zeitschr.*, 1916, **74**, 109.
- Ueber die Verstärkung der Enzymwirkung durch kleinste Mengen in ihrer Zusammensetzung bekannter Substanzen. *Biochem. Zeitschr.*, 1927, **181**, 194.
- Ueber die Einwirkung des Fluors auf die Urease. *Biochem. Zeitschr.*, 1928, **198**, 163.
- JACOBY (M.) und UMEDA (N.). — Ueber die Einwirkung von Serum und von Aminosäuren auf Ureasen. *Biochem. Zeitschr.*, 1915, **68**, 23.
- KATØ (K.). — Ueber Fermente in Bambusschösslingen. *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1911, **75**, 456-474.

- KIESEL (A.). — Ueber das Verhalten des Asparagins bei Autolyse von Pflanzen. *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1909, **60**, 453-476.
- KIESEL (A.) und TROITZKI. — Beitrag. zur Kenntnis der Verbreitung der Urease in Pflanzen. *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1922, **118**, 247.
- KREBS (H. A.). — Deamination of amino-acids. *Biochem. Journ.*, 1935, **29**, 1620.
- Metabolism of amino-acids. The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. *Biochem. Journ.*, 1935, **29** (8), 1951-1969.
- LABORDE (E.) et FISZERMAN (I. H.). — Etude des ferments solubles de la poudre de foie et du rein de porc. *Bull. Sc. pharm.*, 1933, **40**, 65.
- LANG (S.). — Ueber Desamidierung in Tierkörper. *Beitr. chem. Physiol. u. Pathol.*, 1904, **5**, 321.
- LANGSTEIN und NEUBERG. — Ueber einen Fall von Desamidierung im Tierkörper. *Biochem. Central.*, 1904, **2**, 7.
- LESAGE. — Recherches expérimentales sur la germination des spores de *Penicillium glaucum*. *Ann. Scien. Nat. Bot.*, 1896, **2**, 8^e série.
- LOB (W.) und HIGUCHI (S.). — Zur Kenntnis der Placentaenzyme. *Biochem. Zeitschr.*, 1909, **22**, 317.
- LÖEWI (O.). — Ueber das « harnstoffbildende » Ferment der Leber. *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1898, **25**, 511.
- MAEDA (K.). — Zur Kenntnis der Fermente in der Placenta. *Biochem. Zeitschr.*, 1924, **143**, 347.
- MALFITANO (G.). — La protéolyse chez l'*Aspergillus niger*. *Ann. Inst. Pasteur*, 1900, **14**, 60.
- MARSTON (H. R.). — The azine and azonium compounds of the proteolytic enzymes. *Biochem. Journ.*, 1923, **17**, 851.
- MAXIA (M.). — Ricerca dell' asparaginasi nei testicoli di vitello. *Arch. di Farm. sper.*, 1926, **41**, 216.
- MEILLÈRE (G.) et DE SAINT-RAT. — Dosage de l'azote total. Dispositif pour recueillir NH_3 . *Journ. Pharm. Chim.*, 1922, série 7, **25**, p. 100.
- MIHARA (S.) und KATO (K.). — Beiträge zur Kenntnis der Fermente der Stierhoden. *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1911, **75**, 443-455.
- MIQUEL et CAMBRIER. — Traité de Bactériologie, 1902, Paris, Masson, p. 624.
- MIWA (T.) et YOSHII (S.). — Ueber die Bildung der Urease bei *Aspergillus niger*. *Science reports of the Tokyo bunrika dai-gaku*. 1934, Section b., n° 23, **1**, 243-270.

- MURATA and SADAMU. — On the quantitative changes in the enzymes in the liver and in various tissues in the case of the impaired renal functions. *Jap. Journ. Gastroenterol.*, 1935, VII (2), 69-87.
- MYRBÄCK (H.). — Ueber Verbindungen einiger Enzyme mit inaktivierenden Stoffen. *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1926, **158**, 160-301.
- NEUBERG (C.) und CAPPEZZUOLI (C.). — Biochemische Umwandlung von Asparagin und Asparaginsäure in Propionsäure und Bernsteinsäure. *Biochem. Zeitschr.*, 1909, **18**, 424.
- NORTHROP (J. H.). — Crystalline Pepsin. Isolation and tests of purity. *J. gen. Physiol.*, 1930, **13**, 739.
- PASTEUR. — Notes relatives au *Penicillium glaucum*. *C. R. Ac. Sc.*, 1860, **51**, 208.
- Recherches sur le mode de nutrition des Mucédinées. *C. R. Ac. Sc.*, 1860, **51**, 709.
- PÉNAU (H.) et PLÉ (J.). — Etude sur la pepsine. *Bull. Soc. Ch. biol.*, 1928, **10**, 779-783.
- PIUTTI (A.). — Sintesi e costituzione delle asparagine. *Gazz. chim. ital.*, 1888, **18**, 457.
- Sulla preparazione delle B. asparagine attive. *Gazz. chim. ital.*, 1897, **27**, I, 143.
- PRINGSHEIM (H.). — Ueber Pilzdesamidase. *Biochem. Zeitschr.*, 1908, **12**, 15.
- QUASTEL (J.) et WOOLF (B.). — The equilibrium between L-aspartic acid, fumaric acid and NH_3 in presence of resting bacteria. *Biochem. Journ.*, 1926, **20**, 545.
- RAULIN. — Etudes chimiques sur la végétation. Recherches sur le développement d'une Mucédinée en milieu artificiel. *Ann. des Sc. Nat.*, 1869.
- REYNOLDS (F. W.). — Purification and Concentration of Enzyme Solutions. *Ind. and Eng. Chem.*, 1924, **16**, 169.
- ROBERTSON (T. B.). — Studies in the Chemistry of the ion proteid compounds. *Journ. biol. Chem.*, 1907, **2**, 317-383.
- RONCHÈSE (A.). — Sur le dosage de NH_3 . *Soc. de biol. C. R. et mémoires*, 1907, **62**, I, 867.
- SAVARÉ (M.). — Zur Kenntnis der Fermente der Placenta. *Beitr. chem. Physiol. u. Pathol.*, 1907, **9**, 141.
- SCHULZE (B.) und WINTERSTEIN. — Quantitative Bestimmung des Asparagins und Glutarmins. *Abderh. Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden*, 1910, **11**, 513.
- SCHUWIRTH (K.). — Katalitische Desaminierung von Aminosäuren bei Sauerstoffabschluss und bei Anwendung von Wasserstoffakzeptoren. *Biochem. Zeitschr.*, 1932, **254**, 148.

- SHERMAN (H. C.). — Enzymes and Vitamins in présent day Chemistry. *J. chem. Educ.*, 1931, **8**, 652.
- SHIBATA (K.). — Ueber das Vorkommen von Amide spaltenden Enzymen bei Pilzen. *Beitr. chem. Physiol. u. Pathol.*, 1904, **5**, 384.
- SÖRENSEN (S. P. L.). — Enzymstudien. *Bioch. Zeitschr.*, 1970-08, **7**, 45.
- SUMNER (J.-B.). — The isolation and crystallization of the enzyme urease. *Journ. biol. Chem.*, 1926, **69**, 435.
- The recrystallization of urease. *Journ. biol. Chem.*, 1926, **70**, 97.
- Crystalline urease. *Ergebnisse der Enzymforschung*. 1932, **1**, 295.
- SUMNER (J. B.) and HAND (J.). — Crystalline urease. *J. Am. chem. Soc.*, 1929, **51**, 1255.
- SUMNER (J. B.) und MYRBÄCK (K.). — Ueber Schwermetall-Inaktivierung hochgereinigter Urease. *Zeitschr. physiol. Chem.*, 1930, **189**, 218.
- SUPNIEWSKI (J.). — Untersuchungen über den Stoffwechsel der Stickstoffverbindungen in den Kulturen von *Bacillus pyocyaneus*. *Biochem. Zeitschr.*, 1924, **154**, 98.
- TAKAHATA (T.). — Ueber die Gewinnung einer Urease-Enzymlösung aus Bakterien. *Biochem. Zeitschr.*, 1923, **140**, 168.
- THOM (Ch.). — *The Penicillia*. Londen, édit. Baillière, Tindall and Cox 1930.
- THOMAS. — L'utilisation des amides par la Levure. *Ann. Inst. Pasteur*, 1919, **33**, 777.
- VAN SLYKE (D.) and CULLEN (G. E.). — The mode of action of urease and of enzymes in general. *Journ. biol. Chem.*, 1914, **19**, 141.
- A permanent preparation of urease, and its use in the determination of urea. *Journ. biol. Chem.*, 1914, **19**, 211.
- VAUQUELIN (A.) et ROBIQUET. — Découverte d'un nouveau principe végétal dans les Asperges (*Asparagus sativus* L.). *Ann. de Chimie*, 1806, **57**, 88-93.
- VIRTANEN (A. I.) und TARNANEN (J.). — Die enzymatische Spaltung und Synthese der Asparagin säure. *Biochem. Zeitschr.*, 1932, **250**, 193.
- WALDSCHMIDT-LEITZ (E.) und STEIGERWALDT (F.). — Ueber die chemische Natur der Urease. *Zeitschr. physiol. Chem.*, 1931, **195**, 260.
- WILDIERS (E.). — Nouvelle substance indispensable au développement de la Levure. *La Cellule*, 1901, **18**, 313.
- ZAKOWSKI (J.). — Ueber die Einwirkung von Proteasen auf Urease präparate. *Biochem. Zeitschr.*, 1930, **229**, 41.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	9
HISTORIQUE	10
PARTIE EXPERIMENTALE	
CHAPITRE I. — Recherche de l'asparaginase et étude de son évolution dans le mycélium.....	23
a) de divers <i>Aspergillus</i>	32
b) du <i>Penicillium glaucum</i>	44
c) de diverses Mucorinées.....	48
CHAPITRE II. — Recherche de l'asparaginase et étude de son évolution dans les Levures.....	63
CHAPITRE III. — Recherche de l'asparaginase dans les Champignons supérieurs.	81
CHAPITRE IV. — Recherche de l'asparaginase dans les Graines.	87
CHAPITRE V. — Recherche de l'asparaginase dans les Bactéries.	91
CONCLUSIONS GÉNÉRALES.	93
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	95

ERRATA

Fig. 6, page 55 : lire Cœrulea au lieu de Cœrula.

Tableau XXII, page 79 : lire Sporobolomyces au lieu de Sporobolomyres.

Tableau XXIV, page 86 : lire Muscatia au lieu de Muxaria.

